



Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

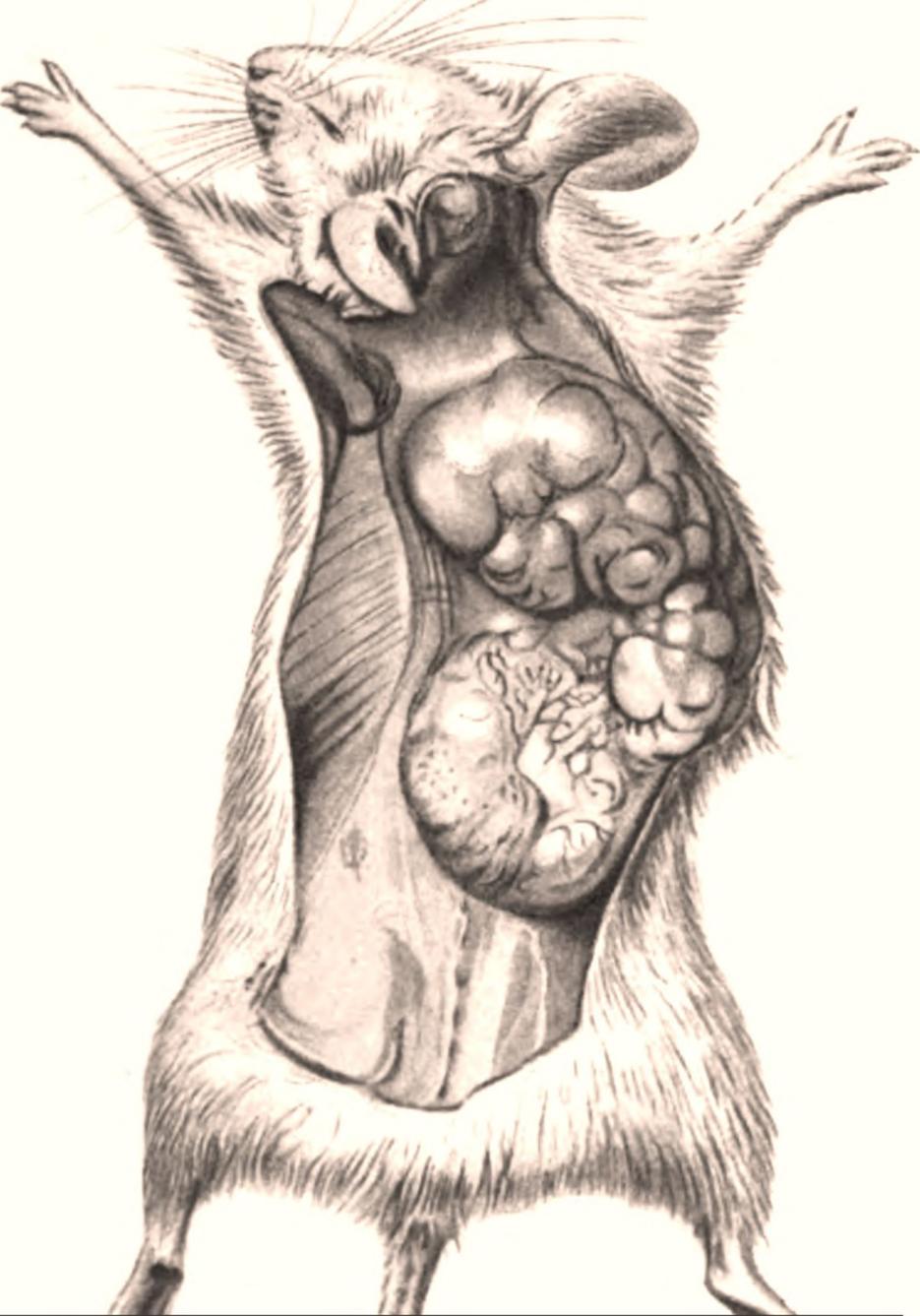
Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

- + *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.
- + *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.
- + *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.
- + *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter <http://books.google.com> durchsuchen.



*Centralblatt für Bakteriologie,
Parasitenkunde und ...*



THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA
DAVIS

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

Erste Abteilung. XXXIV. Band.

Originale.

CENTRALBLATT
für
Bakteriologie, Parasitenkunde
und Infektionskrankheiten.

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Professor Dr. Loeffler
in Greifswald,

Professor Dr. R. Pfeiffer
in Königsberg

und

Staatsrat Professor Dr. M. Braun
in Königsberg

herausgegeben von

Prof. Dr. Oscar Uhlworm in Berlin.

Erste Abteilung. **XXXIV. Band.**

Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde.

Originale.

Mit 21 Tafeln und 59 Abbildungen im Texte.

J e n a ,
Verlag von Gustav Fischer.
1903.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY

DAVIS

Digitized by Google

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Differentialdiagnostik einiger pathogener Bakterienarten.

[Aus dem Laboratorium von Prof. Dr. S. Winogradsky im Kaiserl.
Institute für experimentelle Medizin in St. Petersburg.]

Von **W. Omellanski.**

In der vorliegenden Notiz beabsichtigen wir, die Aufmerksamkeit auf einen neuen Nährboden zu lenken, der ein gutes diagnostisches Hilfsmittel zur Unterscheidung vieler nahe verwandter Bakterienarten abgibt. Die Bedeutung derartiger Untersuchungen, zumal wenn dieselben klinisch wichtige Mikroben betreffen, ist eine so augenscheinliche, daß es wohl unnütz sein dürfte, hierüber viel Worte zu verlieren.

Mit der Frage von der Zersetzung der Ameisensäure durch Mikroben beschäftigt¹⁾, haben wir zu speziellen Zwecken vielfach einen Nährboden angewandt, welcher aus gewöhnlicher Fleischbrühe, versetzt mit 0,5 bis 1 Proz. ameisensaurem Natron und Phenolphthaleïn, bestand und durch Agar (2 Proz.) gelatiniert wurde.

Schon früher sind Versuche gemacht worden, das Phenolphthaleïn zu diagnostischen Zwecken zu verwenden, doch ist es erst in letzter Zeit Zielleczky²⁾ gelungen, befriedigende Resultate zu erzielen. Den Umstand benutzend, daß die Bakterien in verschiedenem Grade befähigt sind, eine Säureentwicklung hervorzurufen, züchtete Zielleczky diverse Bakterienarten auf alkalischen Nährböden, welche mit Phenolphthaleïn versetzt und mithin gefärbt waren. Während des Wachstums einiger Bakterien wurde ein schnelles Schwinden dieser Färbung durch Säuerung des Nährbodens wahrgenommen. So trat bei parallelen Kulturen von *B. coli* und *B. typhi* in der ersteren schon nach 5—8 Stunden eine Abnahme der Färbung, nach 24 Stunden aber gänzliche Entfärbung auf, während die Kultur des Typhusbacillus in den ersten 8 Stunden ihre Farbe überhaupt nicht veränderte und nach 24 Stunden nur eine geringe Abnahme der Färbung zeigte (geringer als die Kultur des *B. coli* nach 8 Stunden). Ließ man die Kulturen weiter im Brutschranke stehen, so begannen die des *B. coli* nach 3 Tagen wieder rot zu werden, während der Typhusbacillus dieselbe Erscheinung erst einen Tag später erkennen ließ.

Wie gleich gezeigt werden soll, haben wir das Phenolphthaleïn in entgegengesetztem Sinne angewandt, d. h. bei uns bestand das positive Resultat im Auftreten der alkalischen Reaktion, also in der Färbung des Nährbodens, was viel deutlicher und schärfer wahrnehmbar ist als die Entfärbung des Nährbodens, wie sie bei Zielleczky stattfand.

Das Phenolphthaleïn setzten wir unserem Nährboden gemäß den Angaben Zielleczkys zu. Die Stammlösung des Phenolphthaleïns wurde durch Lösen von 0,5 g dieser Substanz in 100 ccm eines Ge-

1) Eine ausführliche Mitteilung über diese Frage soll in nicht ferner Zeit veröffentlicht werden.

2) Zielleczky, R., Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXII. p. 752.

menges gleicher Teile von Alkohol und Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde vor der Anwendung mit dem 20-fachen Volumen Wasser verdünnt und dann in einer Quantität von 1 ccm auf 5 ccm Agar resp. 0,7 ccm auf 5 ccm Bouillon zugesetzt.

Die Bouillon war lackmusneutral bereitet, so daß sie ihre ursprüngliche Farbe durch den Zusatz von Phenolphthalein nicht änderte.

Die Zersetzung der Ameisensäure durch die Mikroben führt zur Entwicklung von Wasserstoff und Kohlensäure. Wurden ameisen-saure Alkalisalze der Zersetzung unterworfen, so bleibt ein Teil der aus-
geschiedenen Kohlensäure an das Alkali gebunden. Es häufen sich auf diese Weise im Nährboden lösliche Karbonate an, und mit fortschreiten-
dem Wachstum der Bakterien wird derselbe mehr und mehr alkalisch, was sich durch das Auftreten einer Rosafärbung durch Phenolphthalein kenntlich macht.

Der hierbei beobachtete Farbenwechsel erfolgte in unserem Falle, wo wir ameisen-saures Natron durch den von uns isolierten Mikro-
organismus zersetzten, so schnell und der Uebergang von der normalen Farbe der Bouillon zur hochroten Phenolphthaleinfärbung trat so scharf hervor, daß wir auf den Gedanken kamen, diesen Nährboden dazu zu verwenden, um verschiedene Mikroben durch ihr ungleiches Verhalten zur Ameisensäure zu charakterisieren.

Hinsichtlich des letzteren Punktes besitzen wir bereits ziemlich ausführliche Kenntnisse, welche wir hauptsächlich den sorgfältigen Untersuchungen Maassens¹⁾ verdanken. Dieser Forscher züchtete verschiedene Mikroben in 1-proz. Peptonlösung unter Zusatz der nötigen Mineralsalze sowie $\frac{1}{10}$ normaler Lösungen von Salzen verschiedener Säuren, unter anderem auch von ameisen-saurem Natron. Doch können die Schlußfolgerungen, die der genannte Forscher betreffs des ungleichen Verhaltens verschiedener Bakterien gegen Ameisensäure formuliert hat, natürlich nur mit gewissen Einschränkungen acceptiert werden, da es wohl möglich ist, daß bei anderer Beschaffenheit des Nährbodens, anderer Temperatur u. dgl. ein anderes Verhalten der Bakterien gegen Ameisen-säure zu Tage treten würde.

Wir haben daher, ungeachtet der über diesen Gegenstand bereits bekannten Daten, beschlossen, auf unserem Nährboden das Wachstum einiger Gruppen nahe verwandter Mikroben zu prüfen, und zu diesen Versuchen diejenigen unter denselben gewählt, deren Differentialdiagnostik ein klinisches Interesse bietet.

Als Prüfstein der Methode wählten wir die Unterscheidung von *Bac. typhi abdominalis* und *Bact. coli commune*, und nahmen von jeder dieser beiden Arten je 2 Kulturen verschiedener Provenienz in Arbeit. Da in beiden Versuchsreihen die nämlichen Resultate erhalten wurden, wollen wir dieselben gleichzeitig beschreiben. In diesen, wie auch in allen übrigen Fällen wurde die Impfung auf schräger Agarfläche in Reagenzgläsern vorgenommen, und zwar so, daß die Platinöse mit der ihr anhaftenden Kultur nicht nur die ganze Oberfläche des schräg erstarrten Agars, sondern auch das Kondensationswasser infizierte, was, wie wir sehen werden, für die Charakteristik der Mikroben von Bedeutung ist. Unser Nährboden erwies sich als günstiger für das *B. coli*, welches auf demselben überaus üppig emporwuchs, und weniger günstig für den *B. typhi*, dessen Wachstum etwas schwächer ausfiel

1) Maassen, A., Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XII. 1896. p. 340.

als auf dem üblichen Agar. Die ersten Anzeichen der eingetretenen Zersetzung der Ameisensäure machen sich beim *B. coli* meist schon nach 3—4-stündigem Stehen im Thermostaten bei 37° bemerkbar und äußern sich in einer Gärung der Kondensflüssigkeit. In diesem Moment ist noch keine Färbung des Nährbodens vorhanden, dieselbe erscheint erst nach 5—8 Stunden. Die ersten Spuren der Färbung werden gewöhnlich im oberen Teile des Gläschens, wo die Agarschicht am dünnsten ist, wahrgenommen, sodann breitet sich dieselbe allmählich nach unten hin aus, indem sie unmittelbar unter dem Impfstrieche auftritt, um nach 2—3 Tagen die ganze Gallerte durchzufärben. Am längsten bleibt die ursprüngliche Farbe des Nährbodens unten erhalten, insbesondere wenn die Abschrägung des Agars nicht unmittelbar am Boden beginnt, sondern in einiger Entfernung von demselben. Im letzteren Falle ist der untere Teil des Agars häufig von Gasblasen zerrissen, welche sich durch Gärung der auf den Boden des Glases durchgesickerten Flüssigkeit bilden. Hat der Nährboden einmal seine intensiv rote Farbe angenommen, so bewahrt er dieselbe, solange man die Kultur auch stehen lassen mag.

Ganz anders verhielt sich der *Typhusbacillus*. Erstens, konnte niemals eine Gärung der Kondensflüssigkeit beobachtet werden. Dann erschien die Rosafärbung des Nährbodens zuerst am 2.—3. Tage, bisweilen auch später, und hatte, was besonders wichtig ist, einen ganz anderen Charakter als beim *Bact. coli*, so daß man die beiden Kulturen in keinem der Wachstumsstadien miteinander verwechseln kann. Die unter Einfluß des *Typhusbacillus* hervorgebrachte Färbung ist nämlich anfangs eine schwach rosa-gelbliche, welche mit zunehmendem Alter der Kultur einen etwas gesättigteren ziegel- oder fleischroten Ton annimmt. Eine gleichalterige Kultur des *Bact. coli* dagegen, die etwa 10 Tage bei 37° gestanden hat, nimmt einen satt roten, etwa dem Saft rotter Rüben ähnlichen Ton an.

Stellen wir nun das über *Bac. typhi* und *Bact. coli* Gesagte zusammen, so konstatieren wir zwischen denselben folgende Unterschiede:

1. Tag. a) *Bac. typhi*: Schwächeres Wachstum als beim *Bact. coli* mit Wahrung der ursprünglichen Farbe des Nährbodens. Abwesenheit von Gärung im Kondenswasser.

b) *Bact. coli*: Ueppiges Wachstum, welches dem Wachstum auf gewöhnlichem Agar nicht nachsteht. Deutliche Rosafärbung des Nährbodens. Gärung des Kondenswassers.

Folgende Tage. a) *Bac. typhi*: Allmählich, am 2.—3. Tage erscheinende und sehr langsam zunehmende ziegelrote Färbung des Agars. Gärung tritt nicht ein.

b) *Bact. coli*: Schnelle Rotfärbung des Nährbodens in 2—3 Tagen bis zu gesättigter roter Farbe. Stürmische Gärung im Kondenswasser, wobei das untere Ende der Agarmasse von den Gasbläschen zerrissen wird. Die Gärung steht erst still, wenn aller Agar durch und durch rot gefärbt ist.

Die von uns beschriebene Methode unterscheidet sich vorteilhaft von der Methode Zielleczkys darin, daß 1) der Farbenwechsel von Gelb zu Rot unvergleichlich deutlicher ist als der umgekehrte, daß wir 2) hier ein neues Merkmal in der Gärung des Kondenswassers haben, und daß 3) der Farbenton, den die *Typhuskultur* annimmt, sich von demjenigen deutlich unterscheidet, der für das *Bact. coli* charakteristisch ist.

Es ist bemerkenswert, daß bei Zielleczky die Entfärbung des Agars bedeutend später vor sich ging als die Entfärbung der Bouillon. In unserem Falle wurde gerade das Gegenteil beobachtet. Doch kommt in Bouillonkultur ein anderes Merkmal zu Hilfe, welches ebenso leicht die beiden Mikroorganismen zu unterscheiden gestattet: das ist die reichliche Gasentwicklung in den Kulturen des *Bact. coli*, die bereits 3—4 Stunden nach der Impfung beginnt¹⁾. In Bouillonkulturen des *Bac. typhi* gelang es uns nicht, Gasbildung zu konstatieren. Der Unterschied tritt besonders scharf hervor, wenn man die Kulturen schüttelt. Die Typhuskultur schäumt hierbei nicht, die Kultur des *Bact. coli* dagegen bedeckt sich mit einer dicken Schaumschicht. Die Proben lassen sich besser in Reagenzgläsern mit hoher Bouillonschicht anstellen.

Setzen wir statt Phenolphthalein Methylenblaulösung (1 : 100), 5 Tropfen zu 500 ccm Agar, so gewahrten wir in den Kulturen des *Bact. coli* eine fast vollständige Entfärbung nach Ablauf von 6—7 Stunden (bei 37°), während die Typhuskulturen zu dieser Zeit ihre Farbe noch bewahren (bisweilen wird dieselbe etwas blasser). Auch in diesem Falle empfiehlt es sich, die Kulturen durchzuschütteln. In der Typhuskultur wird dadurch die Farbe, welche eben beginnt, zu erblassen, wieder hergestellt, während das Schütteln die Kulturen des *Bact. coli*, die mit Gasen gesättigt sind, nur wenig beeinflusst.

Gute Resultate haben wir auch mit Indigokarmin erhalten: eine 2-proz. Lösung des Farbstoffes wurde gesondert sterilisiert und 0,1 ccm davon zu 10 ccm flüssigem, aber nicht mehr heißem Agar zugesetzt. Der Umschlag von Blau ins Gelb ist mit *Bact. coli* bereits nach 15 bis 20 Stunden bemerkbar. Auf Bouillon tritt die Entfärbung viel später ein. *Bac. typhi* zeigt dieselbe Erscheinung erst am 3.—4. Tage der Kultur.

Vollkommen analog dem *Bact. coli* verhält sich *Bac. Neapolitanus* Emmerichs, welcher als eine der Abarten des *Bact. coli* angesehen wird. Es wiederholen sich nicht nur dieselben Erscheinungen (Rotfärbung des Nährbodens, Gärung etc.), sondern es geschieht auch in derselben Frist.

Ferner verglichen wir das Verhalten von *Bac. diphtheriae* und von *Bac. pseudodiphthericus* auf demselben Nährboden. Auch hier arbeiteten wir mit je 2 Kulturen verschiedener Provenienz. Der *Bac. diphtheriae* wächst zwar deutlich auf diesem Nährboden, doch ist seine Entwicklung im ganzen eine schwache und die Färbung bleibt aus. Dagegen wächst der *Bac. pseudodiphthericus* außerordentlich üppig, als dicker Belag von gelblicher Farbe, und ruft am 2.—3. Tage eine Färbung hervor, die allerdings nicht so intensiv ist, wie beim *Bact. coli*. Eine Gärung des Kondenswassers wird hier nicht beobachtet.

Bei vergleichender Prüfung von Diphtherie- und Pseudodiphtheriekulturen empfiehlt es sich, weniger *Natr. form.* zuzusetzen, nämlich 0,5 Proz. oder sogar noch weniger. In der Pseudodiphtheriekultur tritt dann die Färbung früher auf (vor Ablauf von 24 Stunden) als in Nährböden mit 1 Proz. *Natr. form.*, dabei aber wird auch das Wachstum der

1) Das Gas, welches Kulturen des *Bact. coli* in Bouillon mit Zusatz von ameisensaurem Natron entwickeln, besteht aus Wasserstoff und Kohlensäure. Bei anaërober Gärung setzte sich das Gas zweier Portionen folgendermaßen zusammen:

H_2	CO_2
1) 76,9 Proz.	23,1 Proz.
2) 78,3 "	21,7 "

Diphtheriekultur bedeutend erleichtert, ohne daß dieselbe sich dadurch färbt. Außerdem schadet es nicht, wenn man dabei auch das Neutralisieren der Bouillon viel genauer, nämlich mit Phenolphthaleïn als Indikator ausführt. Dagegen ist eine solche Neutralisation bei Versuchen mit *Bac. typhi* und *Bact. coli* gar nicht vorteilhaft, da in diesem Falle bald nach dem *Bact. coli* auch die Typhuskultur sich, wenn auch schwächer, zu färben beginnt. Der Diphtheriebacillus hat nämlich auf Ameisensäure gar keine Wirkung, der Typhusbacillus dagegen eine schwache, aber deutliche, und so erklärt es sich, daß eine ganz scharfe Einstellung der Nährlösung auf Phenolphthaleïn im ersten Falle nichts schaden kann, im zweiten aber (*Typhusbacillus* versus *Coli comm.*) die Differenzen eher an Schärfe einbüßen. Diese Beobachtung stimmte vollkommen mit den diesbezüglichen Daten von Maassen überein. So gibt er an:

Bac. typhi abdominalis: Deutlicher Ameisensäureverbrauch.

Bact. coli commune: Ziemlich starker Ameisensäureverbrauch.

Bact. diphtheriae hominum: Kein Ameisensäureverbrauch.

Der *Bac. pseudodiphthericus* ist von Maassen nicht untersucht worden. Nach unseren Versuchen zu urteilen, müßte man in seiner Rubrik vermerken: „Deutlicher Ameisensäureverbrauch“.

Dank der freundlichen Mitwirkung von Prof. Dr. D. Zabolotny wurde es uns ermöglicht, auch das Wachstum des *Bac. pestis* verschiedener Provenienz auf unserem Nährboden zu erproben. Zu diesen Versuchen wurden verwandt:

a) Pestbacillen verschiedener Provenienz, isoliert aus Menschen bei den Epidemien in Mongolei, Wladimirowka, Batum, Odessa, Glasgow, Bombay und Rosario.

b) Ein Pestbacillus, der aus Rattenleichen in Odessa isoliert worden war.

c) Ein Pestbacillus, welcher ebenfalls aus Ratten in Kapstadt erhalten worden war (*Bac. Edingtoni*).

Parallel wurde verwandt:

d) *Bac. pseudotuberculosis rodentium* (Pfeiffer), welcher dem Pestbacillus nahe steht und leicht mit demselben verwechselt werden kann, da er unter den Nagetieren eine pestähnliche Erkrankung hervorruft.

Alle die erwähnten Pestbacillen ohne Ausnahme entwickeln sich auf unserem Agar schwächer als auf gewöhnlichem, und rufen keine Färbung hervor. *Bac. pseudotuberculosis rodentium* dagegen färbt den Nährboden rot.

Weiter haben wir dasselbe Substrat (mit 0,5-proz. Natr. form.) zur Diagnose einiger Bacillen der Anthraxgruppe angewandt. Wir nahmen *B. anthracis*, *B. anthracoides*, einen Anthrax-ähnlichen, aus Mist von uns isolierten Bacillus und *B. subtilis*.

B. anthracis wächst schwach und ruft keine Spur von Färbung hervor.

B. anthracoides entwickelt sich dagegen sehr üppig und färbt nach 30—40 Stunden den Nährboden rosa, nicht rein, sondern mit einem bräunlichen Ton.

B. subtilis endlich und der Anthrax-ähnliche Bacillus aus Mist wachsen mäßig gut, wobei auch eine schwache Rosafärbung des Bodens eintritt, aber viel später als mit *B. anthracoides*, nämlich am 4.—5. Tage.

Der Cholera vibrio und die ihm nahe stehenden Arten verhielten sich sämtlich gegen unseren Nährboden negativ, was ja auch nach den

Daten von Maassen vorauszusetzen war. Wenn auch einige unter denselben, wie z. B. *Vibrio Finkler-Priori*, deutliches Wachstum zeigen, so rufen sie doch keine Färbung hervor. Wir haben geprüft: *Vibrio cholerae asiaticae*, *V. Milleri*, *V. Finkler-Priori* und *V. Metschnikovi*.

Ebenso negative Resultate haben wir auf unserem Nährboden (0,5-proz. Natr. form.) mit einigen säurefesten Bakterien erhalten: 1) *B. tuberculosis*, 2) *B. von L. Rabinowitsch*, 3) *B. Mölleri*, 4) einem aus verschiedenem Unkraut im Jurjewer Veterinär-Institut isolierten *Bacillus*, 5) einem auf Timotheusgras in Jurjew und der Krim gefundenen *Bacillus*. Der Boden erwies sich als für diese Arten vollständig untauglich, obgleich wir ihn in einigen Versuchsreihen auch mit Zusatz von 7 Proz. Glycerin anwandten.

Zum Schlusse erwähnen wir, daß man, um dasselbe Prinzip der Begünstigung der alkalischen Reaktion zu differentialdiagnostischen Zwecken anzuwenden, auch andere Fettsäuren statt Ameisensäure benutzen könnte. Wir gebrauchten auch 1-proz. Natr. acet. mit Phenolphthalein bei Versuchen mit 1) *B. typhi* abd. und *B. coli*, 2) *B. diphth.* und *B. pseudodiphth.* Es ging dabei ähnlich wie mit Natr. form., nur war die Färbung der *B. coli*- und *B. pseudodiphth.*-Kulturen 1) nicht so intensiv, 2) trat dieselbe etwas später ein und 3) war keine Gärung des Kondenswassers in *Coli*-Kulturen bemerkbar.

Nachdruck verboten.

Tuberkulosestudien.

Von Dr. A. Köppen in Norden.

I. Methode für die Agglutinationsprüfung der Tb¹⁾.

Bei dem zuerst an eigenbeweglichen Bakterien beobachteten Agglutinationsphänomen waren zwei Phasen zu unterscheiden, das Stadium des Unbeweglichwerdens der Bakterien und dasjenige der Verklebung (Verklumpung) jener. Als die Agglutinationsprüfung auch auf Bakterien ohne Eigenbewegung ausgedehnt wurde, ließen sich selbstverständlich keine zwei Stadien unterscheiden; es konnte lediglich die Verklumpung zur Wahrnehmung gelangen. Bei Bakterien, welche, wie die Tb, in festen Verbänden wuchsen, mußte dieser Zusammenhang zunächst gelöst werden, wenn von einem Eintritt der Verklumpung die Rede sein sollte. Arloing (Mitt. a. d. Congr. f. inn. Med. in Montpellier. 1898) erreichte dies, indem er tuberkulöses Material nach Passage durch den Tierkörper auf Kartoffel und von dort auf Bouillon, welche täglich geschüttelt wurde, impfte. So wuchsen die Tb einzeln, hatten aber an Virulenz bedeutend eingeblüßt.

Von deutschen Forschern ist außer Koch (1) auch Beck und Lydia Rabinowitsch (2) die Züchtung des Arloingschen Stammes gelungen; doch haben sie wegen einiger Abweichungen der ihrigen die Ursprungskultur des Lyoner Bakteriologen zu ihren Versuchen vorgezogen; ebenso haben sich Bendix (3), Rumpf-Guinard (4), Moeller (5) und Ruitinga (5a) derselben bedient. Moeller gibt aus-

1) Dieselbe war bereits vor länger als einem Jahre im Prinzip fertig.

drücklich an, daß er die erforderliche Gleichmäßigkeit nicht selbst habe erzielen können. Auch Gebhard und von Torday (6) betonen den leichten Mißerfolg des Arloingschen Verfahrens. Neuerdings hat Courmont (7) die Kulturen verdünnt und formolisiert, wodurch die Anwendbarkeit zwar erleichtert, die Umständlichkeit der Gewinnung der Agglutinationsflüssigkeit aber nicht abgeschafft wird. Das Mißliche ist, daß trotz genauester Beachtung der Vorschrift die Kultur nach des Erfinders (8) eigenem Zugeständnis nicht immer gleichmäßig ausfällt. Dies ist nicht verwunderlich, denn das Wachstum des Arloingschen Tuberkelbacillus ist ein so abnormes, daß dieser als ein reines Kunstprodukt anzusehen ist. Die Züchter nennen ihn mit Recht eine künstlich geschaffene Varietät des Kochschen Bacillus. Wenn sie dann aber hinzufügen, daß diese ihr Analogon in der Natur finden könne, so fehlt für diese Vermutung jeder Anhalt. Wenn die Nachzucht solcher Spielarten noch einigermaßen gleichmäßig ausfällt, so ist dies größtenteils einem glücklichen Zufall zu verdanken.

Die berührten Uebelstände veranlassten v. Behring und Koch, eine andere Agglutinationsflüssigkeit herzustellen.

v. Behring (9) verwandte abgetötete Tb, welche zerkleinert in alkalischem Wasser emulsiert wurden. Am zweckmäßigsten erwies sich die Einwirkung von 1 Liter $\frac{1}{2}$ -proz. Natronlauge auf 10 g getrockneter und zerkleinerter Tb während 8 Tage bei 37°. Die alkalische Reaktion wurde durch Essigsäure abgestumpft.

In ähnlicher Weise ging Koch (l. c.) vor, der die zu Staub gemahlene Tb in der 100-fachen Menge Karbol Kochsalzlösung aufschwemmte, 6 Minuten zentrifugierte und dann zum Gebrauch auf das 10000-fache verdünnte.

Beiden Verfahren gemeinsam ist, daß die Tb nicht vereinzelt, sondern zerstückelt werden.

Als Mangel beider Verfahren ist die Veränderlichkeit des Agglutinationstitres zu nennen. Letzterer steigt im Laufe der Zeit in erheblicher Weise; nach Romberg (10), dem ich beipflichte, bei der v. Behring'schen Flüssigkeit durch Ausfallen der wachsartigen Bestandteile der Tb, bei der Kochschen Flüssigkeit vielleicht noch außerdem zufolge des Karbolsäurezusatzes. Diese Unbeständigkeit muß notwendigerweise die Beantwortung der Frage, ob eine zu prüfende Substanz nach einiger Zeit an agglutinierender Wirkung gewonnen hat oder nicht, erschweren.

Ein weiterer Uebelstand der Kochschen Flüssigkeit ist ihre geringe Haltbarkeit; die Stammflüssigkeit hält sich im Eisschrank nicht länger als 14 Tage. Welche Unbequemlichkeit dies mit sich bringt, braucht nicht weiter ausgeführt zu werden. Schließlich dürfte es wohl auch zweifelhaft sein, ob durch das Zentrifugieren immer dieselbe Menge fester Substanz eliminiert wird. Wenn dies aber nicht geschieht, kann die Zusammensetzung der Flüssigkeit jedesmal nicht gleichmäßig ausfallen.

Ich komme nunmehr auf die Anstellung der Probe zu sprechen. Während Arloing und v. Behring bzw. Romberg die Klärung der Agglutinationsflüssigkeit als Zeichen der eingetretenen Agglutination ansprechen, nimmt Koch, genötigt durch die geringe Opaleszenz seiner Probeflüssigkeit als unterste Grenze das Vorkommen eines bei makroskopischer Betrachtung eben noch deutlich erkennbaren schwebenden und gleichmäßig verteilten Niederschlages an.

Dieser Niederschlag beweist aber noch keine Agglutination! Wenn man ein mikroskopisches Präparat von einem Tropfen einer derart be-

einflußten Probeflüssigkeit mit erkennbaren, also nicht zu Staub gemahlene Tb untersucht, so liegen nur ganz wenige Tb in ganz kleinen lockeren Häufchen zusammen; die weitaus meisten Tb liegen einzeln. Von den Häufchen ist es noch zweifelhaft, ob sie wirklich agglutiniert sind oder ob nicht vielmehr die Tb im Präparat zusammengetrieben sind. Man darf wohl annehmen, daß diese makroskopische „grisselige Trübung“, wie ich den Niederschlag nennen möchte, keine Agglutinations-, sondern eine Präzipitationserscheinung ist.

Auch durch vergleichsweise Prüfung zeigt es sich, daß grisselige Trübung und Agglutination nicht identisch sein können. Ein Blick auf die von Rumpf und Guinard veröffentlichte Tafel, welche den gleichzeitigen Ausfall der Agglutinationsprüfung nach Arloing und Koch darstellt, lehrt, daß, eingerechnet einer leichteren Agglutinierbarkeit der Kochschen Flüssigkeit, unmöglich dieselbe Probe vorliegen kann.

Dieselbe Beobachtung machte Thellung (11), welcher beide Probeflüssigkeiten auf ihre Agglutinierbarkeit durch das Serum von mit Neutuberkulin behandelten Meerschweinchen prüfte. Es reagierten auf die Lyoner Kultur mehrere Tiere negativ, welche die Kochsche Flüssigkeit zum Teil stark agglutinierten.

Beweisend für den positiven Ausfall der Probe ist nur die Klärung.

Für den Verlauf der Agglutination von Wichtigkeit ist die Konzentration, in welcher die agglutinierbare Substanz vorhanden ist, indem je nach dem Verhältnis, in dem die zu prüfende Substanz zu der agglutinierbaren steht, die Bindungsverhältnisse sich ändern¹⁾. Alle Methoden aber arbeiten mit gleichmäßig zusammengesetzter Flüssigkeit, welcher die zu prüfende Substanz in wechselnder Menge zugesetzt wird. Dadurch kommen große Unterschiede in dem Gehalt der Gesamtflüssigkeit an agglutinierbarer Substanz zu stande, und es kann auf diese Weise vorkommen, daß eine Probe mit weniger Serum die Reaktion zeigt, eine solche mit mehr Serum aber nicht.

Nicht ohne Bedeutung ist, wie auch Romberg ausführt, die Reaktion der Flüssigkeit. Da nun das Blut mit dem Stehen immer mehr an Alkaleszenz einbüßt, das Serum bereits nach kurzer Zeit sauer reagiert, so muß auch die Agglutinationsflüssigkeit mit steigendem Serumzusatz sauer, zum mindesten in seiner Reaktion verändert werden, da die bisherigen Methoden die Aenderung des Alkaleszenzgrades nicht berücksichtigen. Denn die Probeflüssigkeit hat überall die gleichgradige Reaktion. Hierdurch wird die Gleichmäßigkeit der Probe beeinträchtigt.

Die Aufgabe, welche ich mir gestellt hatte, war die: Eine Agglutinationsflüssigkeit herzustellen, welche die Tb vereinzelt enthielt, welche leicht und stets gleichmäßig zu bereiten und die nicht nur haltbar, sondern auch unveränderlich und in einer solchen Konzentration brauchbar war, daß sie nach Ablauf der Reaktion eine Klärung sicher erkennen ließ. Außerdem sollten bei Anstellung der Probe Unterschiede im Volumen und des Alkaleszenzgrades wegfallen bzw. ausgeglichen werden.

Es war klar, daß als Ausgangsmaterial nur die gewöhnliche Tb-Kultur in Betracht kommen konnte.

Zunächst hatte ich versucht, durch sorgfältiges Verreiben der Tb mit purer Kalilauge im Achatmörser und bis 12-stündiges Kochen die Tb zu isolieren. Dies gelang aber erst nach häufigem Filtrieren durch

1) Wegen der Einzelheiten muß ich auf die einschlägige Literatur verweisen.

feinstes Filtrierpapier. Zwar ließ sich die so bereitete Aufschwemmung als Agglutinationsflüssigkeit verwerten; es fehlte aber jeder sichere Anhaltspunkt, wieviel Tb auf dem Filter zurückblieben und wie viele schließlich zur Prüfung kamen, da das Anfangsgewicht der Tb wegen der erlittenen Veränderung dieser durch das Kochen nicht in Rechnung gestellt werden durfte.

Tabelle.

No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Serum	500	400	300	250	200	150	100	75	50	25	20	15	10	5
AgFl	500	600	700	750	800	850	900	925	950	975	980	985	990	995
AgE		3,75	5	6	7,5	10	15	20	30	60	75	100	150	300
Ungefähr. Verhältnis von Serum: AgFl	1	1,5	1	1	1	1	1	1,2	1,6	2,4	2,9	3,2	3,3	3,6

So konnte die erste Forderung nach der Gleichmäßigkeit der dargestellten Probeflüssigkeit auf diese Weise nicht erfüllt werden.

Diese Versuche hatten gezeigt, daß die Lockerung der die Bacillen zusammenhaltenden Substanz auf diesem Wege nur unvollkommen erfolgte. Dieser Kitt besteht aus einer wachsartigen Masse und es mußte möglich sein, dieselbe auf physikalischem oder chemischem Wege zu entfernen und dadurch die Tb zu vereinzeln.

Die Behandlung mit Aether führte zu halbwegs befriedigendem Ergebnis. Was aber störte, war der Umstand, daß die Tb nach ihrer Entfettung und Aufschwemmung in Kochsalzlösung jede Emulgierungsfähigkeit vermissen ließen; sie sanken sehr bald zu Boden. Dadurch konnten bei mehrstündigem Stehenlassen der Proben leicht Irrtümer entstehen.

Deshalb entschloß ich mich für die Verseifung.

Die ganze Glycerinbouillonkultur wird auf ein feines Faltenfilter geschüttet. Nach Ablafen der Flüssigkeit werden die Tb, von denen man wegen ihres engen Zusammenhalts nur einen unmerklichen Verlust hat, einigemal mit physiologischer (0,85 Proz.) Kochsalzlösung übergossen, um durch die Entfernung des anhaftenden Glycerins ein vollkommenes Trocknen zu ermöglichen. Dies geschieht nach Aufschütten der Tb auf eine flache Schale im Brütoven unter gelegentlichem Umkehren der Tb im Laufe eines bis mehrerer Tage, je nach Menge der Tb¹⁾.

Es wird nun von den durchaus trockenen Tb ein Quantum, z. B. 1 g, abgewogen, mit der 3-fachen Menge (3 ccm) warmer 33¹/₃-proz. wässriger Kalilauge übergossen und nach gutem Durchgezogenensein, wozu mehrere Stunden nötig sind, portionsweise im Achatmörser auf das sorgfältigste zu einem durchaus gleichmäßigen Brei verrieben, der gar keine Körnung mehr zeigen darf. 1 g Tb verreibt man am besten in 4 Portionen. Die dem Mörser und Pistill anhaftenden Reste werden mit einem weiteren Kubikzentimeter ¹/₈ Kalilauge aufgenommen; das Ganze wird in einer passenden, gut zugedeckten Abdampfschale für mehrere Stunden in den Brütoven gestellt.

Diese starke Kalilauge, welche das Zellprotoplasma nicht angreift, soll während dieser Zeit die Kittsubstanz gleichmäßig durchdringen.

1) Bevor man die Tb trocknet, kann man sie, um jeder Gefahr vorzubeugen, in der flachen Schale durch 10—15 Minuten lange Einwirkung des strömenden Wasserdampfes abtöten.

Danach wird die Schale mit dem Brei auf das kalte Wasserbad gesetzt, in welchem das Wasser im Verlaufe von etwa 15 Minuten zum Sieden gebracht wird. Während dieser Zeit wird der Brei unter fleißigem Umrühren mit dem Glasstabe durch Wasserzusatz auf dickflüssige Konsistenz gebracht und während der nächsten 15 Minuten, in denen die Verseifung, auch unter fortgesetztem Umrühren, vor sich gehen soll, erhalten, was man dadurch erreicht, daß das verdampfte Wasser durch tropfenweisen Zusatz von Spiritus ersetzt wird. Die fertige Seife wird durch allmähliches Zusetzen von heißem destillierten Wasser ad 100,0 gelöst.

Natronlauge gibt feste Seifen und eignet sich deshalb nicht so gut für den vorliegenden Zweck.

Das fertige Präparat nenne ich Agglutinationsstammflüssigkeit. Sie ist von milchigem Aussehen, gibt beim Schütteln einen Schaum und läßt dabei die Tb — wie die Colibacillen im Bakterienurin — in Wolkenbildung erkennen. Im übrigen hat sie ein gleichmäßiges Aussehen und darf vor allem keine Bröckel enthalten. Die Reaktion ist alkalisch. Sie zeigt, jedenfalls infolge des Seifengehaltes, keine Neigung zu faulen oder zu schimmeln und ist deshalb, da sie steril hergestellt werden und unbeschadet ihrer Brauchbarkeit auch hinterher nochmals kurz sterilisiert werden kann, unbegrenzt haltbar. Deshalb sind antiseptische Zusätze, welche sie in ihrer Beschaffenheit ändern könnten, überflüssig; ein Ausfallen der wachsartigen Bestandteile der Tb kann ebenfalls nicht mehr statthaben, da das Fett, welches als Mantel und Kitt diene, verseift ist. Man kann deshalb sagen, daß für absehbare Zeit eine Aenderung des Agglutinationswertes nicht eintritt.

Eine Spur dieser Stammflüssigkeit in einen Tropfen Wasser gebracht, in bekannter Weise gefärbt und mikroskopisch untersucht, zeigt die Tb vereinzelt, in ihrer Form unverändert und gut gefärbt, wenn der Säurealkohol (25-proz. alkoholische Salpetersäure) nicht zu lange einwirkte. Da man annimmt, daß die Tb ihre Säure-Alkoholfestigkeit ihrem Fettgehalt verdanken, so ist ihre erhaltene spezifische Farbfähigkeit ein Zeichen dafür, daß das im Innern der Bacillenleiber enthaltene Fett unbeeinflusst geblieben, daß also nur das Mantel- und Klebefett verseift wurde.

Die gebrauchsfertigen Agglutinationsprobeflüssigkeiten werden so hergestellt, daß je 1 $\frac{1}{2}$ ccm der Stammflüssigkeit ad 50,0, 60,0, 70,0, 75,0, 80,0, 85,0, 90,0, 92,5, 95,0, 97,5, 98,0, 98,5, 99,0, 99,5 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung gebracht wird — AgFl I—XIV.

In allen Gläsern ist der prozentuarische Kochsalzgehalt derselbe; das Volumen, die Konzentration und der Alkaleszenzgrad sind verschieden und zwar je kleiner das Volumen, desto größer die Alkaleszenz und die Dichte. Das bereits bei der Stammflüssigkeit beschriebene „Schüttelphänomen“ tritt hier besonders gut hervor; im übrigen zeigen die Flüssigkeiten ausgeprägte Opaleszenz, deren Stärke sich nach der Dichte richtet.

Von diesen Flüssigkeiten werden aus den verschiedenen Gläsern (I—XIV) in kleine sterile Epronvetten 500, 600 u. s. w. bis 995 cmm gefüllt. Ich bediene mich der in den Apotheken zum Aufnehmen von Zahnwatte viel benutzten Gläser, welche 7 cm lang, $\frac{3}{4}$ cm weit und einen gewölbten Boden haben. Zum Verschuß nehme ich statt Watte Körke, weil bei ersterer ein gehöriges Mischen kaum möglich ist. Leichter im Gebrauch sind Gläser mit eingeschliffenem Glasstöpsel und einge-

brannter Bezeichnung, die man sonst jedesmal aufkleben muß. Jedes derartige Glas kommt aber auf ca. 40 Pfg. zu stehen.

Bei Anstellung der Probe wird der Inhalt der Gläser mit der zu prüfenden Flüssigkeit ad 1000 cmm aufgefüllt und durch mehrmaliges Umkehren gut vermischt. Man erhält dadurch die Verhältnisse des Serums zu Agglutinationsflüssigkeit 1:1 bis 1:200 (cf. Tabelle). Man wird jedoch nicht sämtliche Proben anzusetzen brauchen. Vermutet man ein schwaches Agglutinationsvermögen, so stellt man eine Reihe der unteren Proben an, von den höheren nur einige, und umgekehrt.

Während vor dem Serumzusatz die Konzentration und die Alkaleszenz des Inhalts der Probegläschen dem jeweiligen Inhalt der Gläser mit den Agglutinationsflüssigkeiten entsprach, also verschieden stark und groß war, ist nunmehr — nach dem Zusatz des Serums bezw. der zu prüfenden Flüssigkeit — das Volumen sowohl wie der Gehalt an Tb in allen Gläsern derselbe; ebenso der Salzgehalt, da Serum und Agglutinationsflüssigkeit isotonisch sind. Aber auch der Alkaleszenzgrad wird überall, soweit möglich, derselbe, indem die durch die größere Serummenge herabgedrückte Alkalinität durch die höhere Alkalinität der Agglutinationsflüssigkeit jedesmal ausgeglichen wird. Dieser Ausgleich kann ohne Verschiebung der normalen Verhältnisse nur unter der Bedingung zu stande kommen, daß der Alkaleszenzgrad der größten Verdünnung annähernd dem des Blutes entspricht. Dies ist tatsächlich der Fall, wovon man sich überzeugen kann, wenn man Blut in die Proberröhrchen einbringt. Das Blut wird nicht lackfarben, die roten Blutkörperchen werden nicht zerstört, sondern sie senken sich zu Boden. Aus demselben Grunde läßt sich diese Agglutinationsflüssigkeit auch zur Prüfung des Blutes selbst verwenden.

Die Proberröhrchen werden in den Brutschrank gestellt und ruhig stehen gelassen, bis die Reaktion beendet ist.

Da der Inhalt der Gläser sich nur durch die Färbung infolge des geringeren oder stärkeren Serumzusatzes, nicht aber durch die Dichtigkeit, welche überall gleich ist, unterscheidet, so sind Veränderungen durch den Vergleich der Gläser leicht zu erkennen. Man bedarf, und das ist ein weiterer Vorzug dieser Methode, zum Vergleich keines agglutinierenden Serums als Kontrolle.

Der Ablauf der Reaktion gestaltet sich nunmehr so, daß der Inhalt einiger Gläser sich trübt, er ist opak, undurchsichtig geworden; das Schüttelphänomen ist nicht mehr sicher zu erkennen. Etwas später werden diese Flüssigkeiten grisselig (fein bis grobkörnig getrübt) und trennen sich dann noch in solche, bei denen die suspendierende Flüssigkeit klar wird, und in solche, bei denen dies nicht stattfindet. In den ersteren ist die Reaktion vollkommen positiv, d. h. sämtliche agglutinierbare Substanz ist durch die agglutinierende gebunden. Diesem chemischen Vorgange schließt sich dann der physikalische des Sedimentierens an; wartet man das Ende dieses letzteren ab, so ist die Beurteilung des Ausfalles der Reaktion sehr leicht. Ich verfare zu diesem Zwecke so, daß ich die Röhrchen, welche über Nacht im Brütöfen gestanden haben, am anderen Morgen ins Zimmer stelle. Bei dieser Temperatur scheint mir das Sedimentieren schneller zu gehen. Späterhin am Abend desselben Tages ist auch diese Phase abgelaufen.

Von den anderen Gläsern verändern einige ihren Inhalt gar nicht; einige trüben sich noch. Man darf hierin wohl eine Präzipitationserscheinung sehen; hierzu reicht die im Serum befindliche bindende

Substanz noch aus, während in den Gläsern, deren Inhalt bei unklar bleibender Flüssigkeit grisselig wird, noch ein über die Präzipitation hinausreichender Ueberschuß an bindender Substanz eine unvollständige Agglutination verursacht. Dies läßt sich auch durch die mikroskopische Untersuchung zeigen.

In den hellgebliebenen oder lediglich getrübten Gläsern liegen alle Tb, einerlei aus welcher Höhe des Inhalts man die Probe nimmt, einzeln. Untersucht man eins von den Gläsern, in denen ein grisseliger Niederschlag sich in der unklaren Flüssigkeit zu Boden gesenkt hat, so findet man in den oberen Schichten viele einzelne und manche in kleinen Haufen liegende Tb; das Sediment enthält meist kleine Häufchen von Tb, wenig einzelne — unvollkommene Agglutination. In den Gläsern mit ganz klarer Flüssigkeit befinden sich nach vollendetem Sedimentieren in den oberen Schichten keine Tb, bei ungenügender Sedimentation größere Haufen von Tb, welche auch in beiden Fällen den Boden bedecken — vollkommene Agglutination.

Der einmal gebildete Niederschlag, welcher bei der unvollkommenen Agglutination fein, bei der vollkommenen massig ist, verteilt sich durch Umkehren der Gläser nicht in früherer Weise, d. h. er löst sich nicht, sondern er bleibt deutlich erkennbar.

Reicht die makroskopische Betrachtung auch für alle die Fälle aus, wo das Serum völlig klar zur Verwendung kommt, so ist die mikroskopische Untersuchung doch da notwendig und allein noch im stande, eine Antwort zu geben, wo das Serum bezw. die zu prüfende Flüssigkeit aus einem unglücklichen Zufall oder aus anderen Gründen mehr oder weniger getrübt benutzt wird.

Bei der Prüfung des Agglutinationswertes des Blutes hat man mit der Schwierigkeit zu rechnen, dieses ohne jede Spur von Gerinnung in die Proberöhrchen hineinzubringen. Zu diesem Zwecke muß man das Blut direkt aus der Wunde mittels der vorher mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespülten Pipette entnehmen und ohne Verzug in die durch Umschütteln wandbenetzten Gläschen verbringen, worauf durch mehrmaliges Umkehren das Blut gut verteilt wird.

Die Röhrchen müssen senkrecht im Brutschrank stehen. Bei einem Verhältnis von Blut zu Probeflüssigkeit wie 1:50 ist nach 2 Stunden ca. $\frac{1}{3}$, nach 4 Stunden sind ca. $\frac{2}{3}$ und nach 6 Stunden ist die Gesamtheit der roten Blutkörperchen sedimentiert und liegt als Kuchen am Boden des Glases. Bei geringeren Blutmengen nimmt dieser Vorgang natürlich etwas weniger, bei größeren Blutmengen etwas mehr Zeit in Anspruch. Man könnte denken, daß die sich niedersetzenden Blutkörperchen die Tb mitreißen müßten. Das ist aber nicht der Fall; denn wenn man einen Tropfen der obenstehenden Flüssigkeit untersucht, findet man die Tb wie sonst.

Nach vollendetem Sedimentieren kann man die Reaktion an der darüber befindlichen Flüssigkeit in gewohnter Weise beurteilen.

Den Agglutinationswert berechne ich nicht nach dem Verhältnis, in dem die geprüfte Flüssigkeit zur Menge der Agglutinationsflüssigkeit steht, sondern nach der Menge der festen Substanz, welche durch ein gewisses Quantum der zu prüfenden Flüssigkeit agglutiniert wird und zwar bezeichne ich als Agglutinationseinheit (AgE) das Verhältnis von 1 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit zu 1 mg feste Substanz.

Diese Berechnung setzt eine exakte Bearbeitung der festen Substanz voraus, wie sie in dieser Methode durchgeführt ist, und macht zugleich

allen Ungleichheiten der Testflüssigkeiten, wie sie nach den bisherigen Methoden unumgänglich waren, ein Ende. (Vergleichsweise habe ich in der Tabelle die alte Bezeichnung nebenbei mitaufgeführt.)

Die Handlichkeit der Methode ist wohl ohne weiteres einleuchtend. Hat man einmal mehrere Reihen von Proberöhrchen mit Agglutinationsflüssigkeit beschickt, so ist man jederzeit, die Probe anzustellen, in der Lage. Auch die Sparsamkeit ist nicht gering zu achten und zwar nicht sowohl in betreff der Probeflüssigkeit — (man kann mit 1,0 Tb $\frac{2}{3}$ Millionen Prüfungen vornehmen) — als besonders in betreff des Serums, da man mit 1 ccm derselben und weniger auskommt.

Um die Vorzüge meiner Methode kurz zusammenzufassen, so läßt sich von ihr sagen, daß sie bei stets leicht und gleichmäßig herzustellender, sowie haltbarer und unveränderlicher Probeflüssigkeit die Fehler, welche durch Aenderung des Volumens, der Konzentration und der Alkaleszenz veranlaßt werden, vermeidet und daß sie handlich und sparsam ist.

Ich gebe mich dem Wunsche und der Hoffnung hin, daß diese meine Methode sich bei der Nachprüfung bewähren und daß sie auch bei der Agglutinationsprüfung anderer Mikroorganismen als prinzipielles Vorbild dienen möge.

Literatur.

- 1) Koch, R., Ueber die Agglutination der Tuberkelbacillen und über die Verwertung dieser Reaktion. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 48.)
- 2) Beck, M. u. Rabinowitsch, L., Ueber den Wert der Courmontschen Serumreaktion für die Frühdiagnose der Tuberkulose. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 25.)
- 3) Bendix, E., Zur Serodiagnostik der Tuberkulose. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 14.)
- 4) Rumpf, E. u. Guinard, L., Ueber die Agglutination der Tuberkelbacillen und die Verwertung dieser Reaktion. (Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 8.)
- 5) Moeller, A., Zur Frühdiagnose der Tuberkulose. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 50.)
- 5a) Rutinga, P., Zur Serumdiagnose der Tuberkulose. (Zeitschr. f. Tuberkulose etc. Bd. III. 1902. Heft 6.)
- 6) v. Gebhardt, Fr. u. v. Torday, A., Ueber die Serumdiagnose der Tuberkulose. (Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 28.)
- 7) Courmont, P., Comparaison des résultats du séro-diagnostic tuberculeux et de la cytologie dans les épanchements pleuraux. (Compt. rend. de la Soc. méd. des hôpitaux de Lyon. 1902. No. 3. Centralbl. f. Bakt. Bd. XXXI. 1902. No. 21/22.)
- 8) Arloing, S. u. Courmont, P., Ueber den Wert der Serumreaktion für die frühzeitige Diagnose der Tuberkulose. (Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 48.)
- 9) Romberg, E., Zur Serumdiagnose der Tuberkulose. (Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 18, 19.)
- 10) — —, Weitere Mitteilungen zur Serumdiagnose der Tuberkulose. (Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 3.)
- 11) Thellung, Fr., Experimenteller Beitrag zur Frage der Agglutination und zur Behandlung der Tuberkulose. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXXII. 1902. Orig. No. 1.)

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Frage der Bedeutung anaërober Bakterien bei Darmkrankheiten.

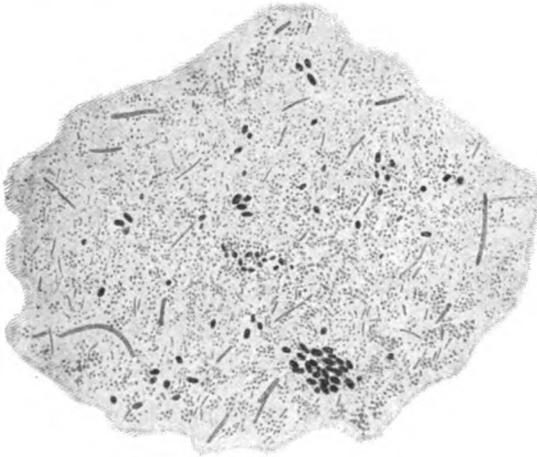
[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich.]

Von Dr. A. Rodella, Assistenten am Institute.

Mit 1 Figur.

In unmittelbarem Zusammenhange mit meinen Publikationen über anaërobe Bakterien des Säuglingsstuhles¹⁾ steht die nachfolgende Mitteilung, welche als eine vorläufige zu betrachten ist.

Die schon früher wiederholt gemachte Erfahrung, daß in den nach der Methode der Tuberkelbacillenfärbung angefertigten Stuhlpräparaten



Im Original sind die größeren Punkte rot, das übrige ist blau gefärbt.

von an chronischem Darmkartarrhe leidenden Patienten sich rundliche säurefeste Gebilde mikroskopisch nachweisen ließen, gab mir Veranlassung, auch bei Säuglingen ähnliche Versuche anzustellen. Das Material wurde auf Objektträger nicht sehr dünn aufgestrichen, in der üblichen Weise fixiert und dann in heißer Fuchsinlösung (Ziehlsche Lösung) $\frac{1}{4}$ Stunde lang gefärbt. Die Entfärbung in 5-proz. Schwefelsäure und nachträglicher Abspülung mit konzentriertem Alkohol war etwas schwächer, als

dieselbe bei der Tuberkelbacillenfärbung zu sein pflegt. Die Grundierung des Präparates mit Methylenblau geschah auch hier in der üblichen Weise.

Für verschiedene chronische und subakute Fälle von Darmkrankheiten kann das hier gezeichnete Präparat als Muster dienen.

Daß die rotgefärbten Gebilde nichts anderes als Sporen von anaëroben Bacillen sind, konnten wir sehr leicht feststellen, dank der großen Widerstandsfähigkeit derselben gegen Wärmeeinwirkung.

Wir ließen in der Tat das mit steriler Bouillon aufgeschwemmte Material 3—4 Minuten bei der Temperatur des siedenden Wassers und impften nachher dasselbe in einige Röhrchen mit flüssigem Agar. Es kamen immer nur anaërober Mikroorganismen zur Entwicklung.

Daß auch in normalen Stuhlgängen sich regelmäßig sporentragende anaërober Bacillen befinden, haben wir schon in den oben erwähnten Arbeiten mitgeteilt. Doch zeigten bei unseren damaligen Untersuchungen

1) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXIX. p. 201 u. Bd. XLI. p. 466.

die direkten mikroskopischen Stuhlpräparate nie so reichliche freie Sporen von anaëroben Bacillen.

Ohne hier an die Frage herantrëten zu können, ob die hier geschilderte Erscheinung in kausalem Zusammenhange mit den Krankheitsprozessen steht, wären wir zufrieden, die Anregung, die hier kurz beschriebene Methode bei Untersuchung pathologischer Stuhlgänge systematisch einzuführen, gegeben zu haben.

Nachdruck verboten.

20 Fälle von Bronchopneumonie bei Keuchhustenkindern, hervorgerufen durch ein influenzaähnliches Stäbchen: *Bacillus pertussis* Eppendorf.

[Aus dem allgemeinen Krankenhause Hamburg-Eppendorf, medizinische Abteilung (Oberarzt Dr. Rumpel).]

Beiträge zur Aetiologie des Keuchhustens.

Von

Dr. Georg Jochmann,
Assistenzarzt der medizinischen Universitätsklinik Breslau, früher Assistenzarzt am Allgemeinen Krankenhause Hamburg-Eppendorf.

und

Dr. Moltrecht,
Assistenzarzt am Hamburg-Eppendorfer Krankenhause.

In einer Mitteilung aus dem Jahre 1901 von Georg Jochmann und Paul Krause¹⁾ wurde festgestellt, daß bei der bakteriologischen Untersuchung des Auswurfes von Keuchhustenkindern in der Mehrzahl der Fälle ein influenzaähnliches Stäbchen gefunden wird, das ausschließlich auf hämoglobinhaltigen Nährböden gedeiht. Dasselbe wurde damals zum Unterschiede von anderen in der Literatur beschriebenen *Pertussis-Bacillen* *Bacillus pertussis* Eppendorf genannt, weil es im Hamburg-Eppendorfer Krankenhause in überwiegender Menge im Keuchhustensputum gesehen wurde.

Es ist ovalär, von der Größe und Form des Influenzabacillus, mitunter zu zweien liegend, nie in Ketten. Es zeigt sehr geringe Neigung zur Scheinfädenbildung; bei schwacher Färbung ist eine Andeutung von Polfärbung vorhanden, da dann die Mitte oft ungefärbt bleibt. Es ist unbeweglich, färbt sich nicht nach Gram und gedeiht nur auf hämoglobinhaltigen Nährböden in der Form von Tautröpfchenkolonien, die von denen des Influenzabacillus nicht unterschieden werden können und die bei durchfallendem Lichte stark Licht brechen und bei auffallendem Lichte zart blaßgrau aussehen.

Gelegentlich jener Mitteilung wurde bereits darauf hingewiesen, daß dieses Stäbchen kein harmloser Sputumbewohner ist, sondern für den kindlichen Körper, der ihn beherbergt, verderblich zu werden vermag. Als Beweis dafür konnten 3 Fälle mit Sektionsbefund aufgeführt werden, in denen es gelang, aus bronchopneumonisch infiltrierten Lungenpartieen durch die Kulturmethode den beschriebenen *Bacillus* zu gewinnen und in 2 Fällen auch mit Sicherheit im mikroskopischen Schnitt nachzuweisen. Die Aussaat von 1 oder 2 Oesen des blutigen Parenchymsaftes der infiltrierten Lungenbezirke auf Glycerinagarplatten führte jedesmal zu dem überraschenden Resultat, daß der *Bac. pertussis* Eppendorf be-

reits auf der Originalplatte nahezu in Reinkultur gedieh. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° waren die Platten übersät mit den charakteristischen Tautröpfchenkolonien des *Bacillus pertussis*, zwischen denen nur selten vereinzelt Kolonien des *Diplococcus lanceolatus* sich zeigten.

Seitdem wurden die Beobachtungen im Hamburg-Eppendorfer Krankenhause weiter fortgesetzt und außer systematisch fortgeführten regelmäßigen Sputumuntersuchungen bei jedem zur Sektion kommenden Keuchhustenkinde, das an einer Bronchopneumonie erkrankt war, eine genaue bakteriologische Untersuchung der erkrankten Lungenpartieen durch das Kulturverfahren, sowie eine pathologisch-anatomische Untersuchung an Schnittpräparaten vorgenommen. Bei allen den zur Sektion gekommenen Keuchhustenkindern war bereits in vivo in dem Sputum der *Bac. pertussis* Eppendorf in Masse gefunden und durch die Kulturmethode isoliert worden. Die bakteriologische Untersuchung geschah in der Weise, daß oberhalb der infiltrierten Lungenpartie die Pleura mit einem glühenden Messer abgesengt wurde, worauf mit einem sterilen Skalpell auf den bronchopneumonischen Herd eingeschnitten wurde. Von dem Parenchymsaft dieses Bezirkes wurden dann mehrere Oesen auf Glycerinagarplatten ausgestrichen. Ein Hinzufügen von Blut zu den Nährböden war überflüssig, da der ausgestrichene Lungensaft selbst schon genügend Hämoglobin enthielt. Auf diese Weise gelang es in 20 Fällen unter 22 Bronchopneumonien jenes influenzaähnliche Stäbchen zu isolieren. Die bekannten strukturlosen transparenten Tautröpfchenkolonien, die denen des Influenzabacillus zum Verwechseln gleichen, waren jedesmal in ganz enormer Menge auf den Platten verbreitet und fanden sich in den meisten Fällen nahezu in Reinkultur. Als Begleiter sahen wir in einzelnen Fällen auf den Platten vereinzelt Kolonien von *Diplococcus lanceolatus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus albus*, *Micrococcus catarrhalis* (Pfeiffer). Dabei konnte jedesmal wieder jenes Phänomen beobachtet werden, auf das wir schon gelegentlich der ersten Arbeit über den *Bac. pertussis* Eppendorf aufmerksam gemacht wurden, daß nämlich in der Umgebung derartiger vereinzelter fremder Kolonien der *Bac. pertussis* ein ganz anderes Wachstum wie gewöhnlich erkennen ließ. Während sonst die Kolonien desselben sehr klein sind, von tautröpfchenartigem Ansehen und gar keine Neigung zeigen zu konfluieren, wachsen sie in der Umgebung fremder Kolonien, z. B. des *Streptococcus*, zu großen Kolonien heran bis zu 2 mm Durchmesser und konfluieren auch zum Teil. Von den Originalplatten aus wurden jedesmal Uebertragungsversuche auf hämoglobinfreie Nährböden: hämoglobinfreien Glycerinagar, Gelatine, Ascitesserum, Ameisenagar, Milch, Lackmusmolke, Bouillon gemacht, jedesmal ohne Erfolg. Dagegen konnte der gefundene *Bacillus* auf hämoglobinhaltigen Nährböden, so z. B. auf Glycerinagar mit menschlichem Placentablut jedesmal in mehreren Generationen fortgezüchtet werden.

Das durch das Kulturverfahren aus den bronchopneumonischen Herden isolierte Stäbchen unterschied sich in keiner Weise von dem so häufig — bis jetzt 60mal — aus dem Sputum von Keuchhustenkindern gezüchteten influenzaähnlichen Stäbchen. Die einzelnen Stämme wichen in ihren morphologischen Eigentümlichkeiten nur wenig voneinander ab, fast stets war eine gewisse Regelmäßigkeit in der Form und Größe der einzelnen Individuen vorhanden, nur bei 3 Stämmen, die aus bronchopneumonischen Lungenpartieen gezüchtet waren, sahen wir ein Abweichen

von dieser Regelmäßigkeit, indem dünnere und plumpere, kürzere und längere Individuen miteinander abwechselten.

Untersucht man systematisch etappenweise den ganzen Bronchialbaum so wie es Pfeiffer (2) gelegentlich seiner Untersuchungen über Influenzapneumonie beschreibt, so findet sich ganz ähnlich wie bei der Influenzapneumonie in dem Ausstrichpräparat des Schleimhautsekretes der Trachea und des Kehlkopfes ein Gemisch von Streptokokken, *Lanceolatus* und *Bac. pertussis*, und je weiter man nach abwärts in die feineren Verästelungen der Bronchien geht, desto mehr überwiegt der *Bac. pertussis*, bis er im Lungengewebe fast allein in Reinkultur angetroffen wird.

Makroskopisch wich der Befund der untersuchten Lungen nicht von den gewöhnlichen Formen der katarrhalischen Bronchopneumonie ab. Graue oder gelblichgraue über die Schnittfläche leicht prominierende Herde von verschiedenster Größe, derber Konsistenz und herabgesetztem Luftgehalt zeigten sich in großer Anzahl innerhalb blutreicher Lungenpartieen. Auf Druck ließ sich aus den Lumina der kleinsten Bronchioli ein gelbliches Exsudat ausquetschen.

Häufig war eine Anzahl bronchopneumonischer Herde konfluiert und es fanden sich dann größere Infiltrationen von grauroter Farbe und stark herabgesetztem Luftgehalt mit glatter Schnittfläche. Dort wo die Herde bis an die Pleura heranreichten, fanden sich zarte graue Auflagerungen auf derselben. Wo das nicht der Fall war, blieb sie glatt und spiegelnd.

Mikroskopisch wurden die Lungen an Schnittpräparaten untersucht, die mit Hämatoxilinesin, nach van Gieson, nach Weigerts Fibrinfärbemethode, ferner mit Orcein gefärbt worden waren. Zur Differenzierung der Bakterien wurde außerdem jedesmal eine Färbung mit polychromem Methylenblau vorgenommen und mit Tanninorange gebeizt.

Die mikroskopische Untersuchung der Lungen ergab im wesentlichen die gleichen Veränderungen, wie sie Pfeiffer bei der Beschreibung der Influenzapneumonie schildert.

Es handelt sich stets um bronchopneumonische, zum Teil zu größeren, ja zu lobären konfluierende Erkrankungsherde in den Lungen. Bei schwacher Vergrößerung heben sich die einzelnen Herde durch ein kernreicheres Zentrum, in welchem die Lungenstruktur fast völlig verwischt ist, und eine hellere Peripherie deutlich voneinander ab.

Die Bronchien sind selbst in den erkrankten Lungenabschnitten zum Teil völlig intakt, meist dagegen mehr oder weniger hochgradig verändert. Oft findet man, und zwar in einzelnen Fällen fast ausschließlich, eine stellenweise oder völlige Desquamation des Epithels ohne tiefer greifende Veränderungen, an anderen Stellen eine Abhebung des Epithels durch Runzelleninfiltration. In vorgeschritteneren Stadien geht dann diese Infiltration in die Tiefe der Bronchialwand um endlich noch auf das peribronchiale Gewebe überzugreifen, während letzteres bei weniger vorgeschrittener Affektion der Bronchialwand, keine Zeichen einer Erkrankung oder nur verschiedene Grade der Hyperämie zeigt.

Der Inhalt der Bronchien und der gleichartig erkrankten Bronchiolen ist meist ein eitriger, seltener ein blutiger. Zwischen und in den Zellen des Bronchialinhalts findet man auch die oben näher beschriebenen Bakterien, doch bei weitem nicht in der Menge, wie das Pfeiffer für seine Influenzafälle beschreibt und abbildet.

Die an einigen Stellen recht reichliche Durchsetzung des peripronchialen Gewebes mit Rundzellen läßt sich vielfach weit in die benachbarten Alveolarepta hinein verfolgen, welche hierdurch und durch die Erweiterung der Gefäße stellenweise eine sehr erhebliche Breite angenommen haben. Nähert man sich dem Zentrum der lobulären Herde, so kann man dort bisweilen einen Schwund der Alveolarepta beobachten.

Die erkrankten Alveolen verhalten sich sowohl im selben Präparat, als besonders bei den verschiedenen Lungen äußerst different. Dem schon bei schwacher Vergrößerung erkennbaren Unterschied zwischen Zentrum und Peripherie der Erkrankungsherde entspricht auch der Zellreichtum der Alveolen sowohl wie ihrer Septa. Während man in jenen an der Peripherie oft nur wenige Epithelien und im wesentlichen eine seröse Flüssigkeit vorfindet, sind die Alveolen, je weiter nach dem Zentrum, um so dichter mit Eiterkörperchen gefüllt, bis schließlich die mit zelligem Exsudat vollgepfropften Alveolen mit ihren ebenfalls dicht infiltrierten Septen die Lungenstruktur kaum mehr erkennen lassen.

Neben solchem, vom Bilde der gewöhnlichen Bronchopneumonien kaum abweichenden Verhalten finden sich nun viel häufiger und ausgehnter als bei ihr regelmäßig in den untersuchten Lungen größere und kleinere Bezirke, in denen der Alveolarinhalt völlig oder zum größten Teile aus roten Blutkörperchen besteht. Letztere finden sich dann auch, wie erwähnt, in den zugehörigen Bronchien. Die hämorrhagischen Lungenabschnitte zeigen meist nur geringe entzündliche Veränderungen.

Auch in den Alveolen findet sich der *Bacillus pertussis* Eppendorf nur in einzelnen Exemplaren, meist frei, mitunter in Zellen liegend. Andere Bakterien wurden nicht gefunden.

Die Färbung auf Fibrin ergibt ein sehr geringes Vorhandensein desselben. Es lokalisiert sich ausschließlich in der Peripherie der Krankheitsherde, und ist auch hier nur in sehr geringer Menge nachweisbar.

Das Verhalten der elastischen Fasern ergab, wie nach neueren Untersuchungen (3) zu erwarten war, keine Veränderungen.

Fassen wir noch einmal das Resultat zusammen, indem wir die drei Beobachtungen der ersten Arbeit (1) hinzurechnen: In 23 unter 25 untersuchten Fällen gelingt es aus bronchopneumonischen Herden, die im Verlauf des Keuchhustens aufgetreten sind und zum Tode der Kinder geführt haben, in überwältigender Menge, meist in Reinkultur, als Erreger dieser Bronchopneumonie ein morphologisch und biologisch vom *Influenzabacillus* nicht zu unterscheidendes Stäbchen nachzuweisen, das bereits in vivo bei den betreffenden Keuchhustenkindern im Sputum in großer Menge gefunden worden war. Dieses nämliche Stäbchen hat der eine von uns (Jochmann) während einer 2-jährigen Untersuchungsperiode bereits in 60 Stämmen aus dem Auswurf von Pertussis-Patienten isoliert und zwar hat er dasselbe, wie in der Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankh. 1903 genauer ausgeführt wird, bei der letzten fortlaufenden Untersuchungsreihe von 40 Fällen in jedem Falle im Stadium convulsivum ohne Ausnahme gefunden.

Man könnte hier vielleicht einwenden, daß bei den im Krankenhaus behandelten Kindern eine Hausinfektion vorliegen kann, so daß dadurch die gleichartigen Befunde bei so vielen Kindern erklärt werden würden. Dagegen ist jedoch zu bemerken, daß die Sputumuntersuchungen stets sofort nach dem Einliefern der Kinder ins Krankenhaus vorgenommen wurden und daß einige von den verstorbenen Kindern, bei

denen in bronchopneumonischen Herden die Bacillen in Reinkultur gefunden wurden, bereits mit diesen Bronchopneumonien ins Krankenhaus kamen und nach wenigen Tagen daran zu Grunde gingen.

Es erhebt sich nun die Frage: Ist dieses influenzaähnliche Stäbchen, das als *Bacillus pertussis* Eppendorf (Jochmann und Krause) beschrieben wurde, der spezifische Erreger des Keuchhustens oder ist er identisch mit dem Pfeifferschen Influenzabacillus?

Daß er eine große Rolle während der Keuchhustenerkrankung spielt, darüber besteht nach diesen Untersuchungen kein Zweifel mehr. Ihm gegenüber tritt der *Diplococcus lanceolatus* zum Beispiel vollkommen in den Hintergrund. Wenn wir den letzteren auch häufig im Sputum der Keuchhustenkinder finden, so ist er an Zahl jenen influenzaähnlichen Stäbchen doch stets sehr unterlegen, vor allem aber fällt ins Gewicht, daß er unter 25 Fällen nur 2mal als Erreger der die *Tussis convulsiva* komplizierenden Bronchopneumonie nachgewiesen wurde während der *Bacillus pertussis* sich 23mal fand.

Mit dem von Pfeiffer beschriebenen Pseudoinfluenzabacillus hat unser influenzaähnliches Stäbchen nichts zu tun, da niemals eine derartig ausgesprochene Scheinfädenbildung, wie sie Pfeiffer beschreibt und abbildet, in den Kulturen des *Bacillus pertussis* beobachtet wurde.

Sehr nahe jedoch steht er dem echten Influenzabacillus. Die Form und Größe, die Art der Lagerung im Sputum, das Verhalten gegenüber der Gram-Färbung, die mangelnde Beweglichkeit, sowie das biologische Verhalten ist völlig dasselbe. Selbst die Neigung, auf Blutagarplatten in Gegenwart von anderen Bakterien in der Nähe fremder Kolonien sogenannte „Riesenkolonien“ zu bilden, wie sie Grassberger (4) für die Influenzabacillen beschreibt, ist ihm zu eigen. Dazu kommt nun auch, daß er ganz ähnliche pathologisch-anatomische Veränderungen setzt wie der Influenzabacillus, wie wir aus den oben angeführten Lungenbefunden ersahen. Daß er auch ähnlich wie der Influenzabacillus noch andere Komplikationen bedingen kann, so zum Beispiel Entzündungen des Mittelohres, beweist ein Fall, bei dem der eine von uns (Jochmann) aus dem Eiter der aufgemeißelten Paukenhöhle den *Bac. pertussis* in Reinkultur nachweisen konnte. Bei demselben Fall fand sich auch eine durch den gleichen Erreger bedingte Bronchopneumonie.

Pfeiffer hat die echten Influenzabacillen stets nur bei Influenzkranken und Influenzarekonvaleszenten angetroffen. Er betonte ausdrücklich diese Tatsache als Beweis für die spezifische Natur der von ihm gefundenen Mikroorganismen. Demgegenüber finden sich in den letzten Jahren Angaben in der Literatur, die gerade für das Kindesalter die Influenzabacillen als eine häufig vorkommende Ursache für Sekundärinfektionen hinstellen.

Meunier (5) gibt an, in 15 Fällen von infantiler Bronchopneumonie, zum Teil im Anschluß an eine herrschende Influenzaepidemie, zum Teil primär nach Angina oder Masern teils aus dem Venenblut, teils aus punktiertem Lungensaft Influenzabacillen erhalten zu haben.

Leiner (6) beschreibt 11 von ihm beobachtete Diphtheriefälle, die zur Sektion kamen und die alle als Komplikation schwere durch Influenzabacillen bedingte Bronchitiden und Pneumonien zeigten. Bei der mikroskopischen und kulturellen Untersuchung fanden sich bis in die

feinsten Bronchien hinab ebenso wie in den pneumonischen Herden Influenzabacillen, vielfach vermengt mit Diphtheriebacillen.

Süsswein (7) hat bei 21 Fällen 10mal den Influenzabacillus bei Masernerkrankungen gefunden. Er untersuchte bei Lebenden das Sekret der Nasengänge, bei Sektionen den Bronchialinhalt und pneumonisches Exsudat. Er schließt daraus, daß Influenza eine sehr häufige Nebenkrankung bei Masern ist.

Jehle (8) ist auf Grund seiner Untersuchungen der Ansicht, daß die Influenza im Kindesalter häufig als sekundäre Infektion zu beobachten ist. Sie sei meist im tieferen Respirationstraktus lokalisiert, könne jedoch auch auf den Tonsillen allein vorkommen, ohne daß es zu einer Infektion der Bronchien kommt. Bei den akuten Exanthemen komme es nahezu regelmäßig zu einem Eindringen der nebenbei vorkommenden Influenzabacillen in die Blutbahn, so zum Beispiel bei Scharlach.

Halten wir zu diesen Literaturangaben noch unsere Befunde hinzu, so geht jedenfalls daraus hervor, daß die Bacillen aus der Influenzagruppe bei den Erkrankungen des Respirationstraktus des Kindesalters eine große Rolle spielen.

Ob aber der von uns beobachtete *Bacillus pertussis* Eppendorf, welcher morphologisch und biologisch mit dem Influenzabacillus übereinstimmt, nun auch identisch ist mit dem Pfeifferschen Influenzabacillus, müssen wir dahingestellt sein lassen, solange wir nicht in der Lage sind, mit unserem *Bacillus pertussis* auch das klinische Bild der Influenza erzeugen zu können — die Spezifität des Pfeifferschen Bacillus für die Entstehung der Influenza vorausgesetzt.

Nachdem jetzt feststeht, daß der *Bacillus pertussis* fast konstant im Keuchhustensputum gefunden wird, wäre es daher immerhin von Interesse, festzustellen, ob in der Nähe von Keuchhustenkindern häufig bei Erwachsenen Influenzaerkrankungen vorkommen oder ob umgekehrt bei gehäuftem Auftreten von Influenzaerkrankungen nun auch eine Zunahme an Keuchhustenfällen in der Nähe der Influenzakranken zu konstatieren ist.

Jedenfalls ist nach unseren Befunden die Wahrscheinlichkeitsannahme nicht mehr unberechtigt, daß dem influenzaähnlichen Stäbchen *Bacillus pertussis* Eppendorf (Jochmann und Krause) bei der Keuchhustenerkrankung eine ätiologische Rolle zukommt, da er fast konstant im Keuchhustensputum vorkommt und fast in allen Fällen die komplizierenden Bronchopneumonien bedingt.

Belege für die bakteriologischen Befunde.

1) Peters, Fritz, 2 Jahr. Diagnose: Pertussis, Rhachitis, Bronchopneumonie, Otitis media duplex. Aus dem Parenchymsaft der Bronchopneumonie in Reinkultur *Bacillus pertussis* Eppendorf. Auf Blutagar fortgezüchtet in 2 Generationen.

2) Stein, 3 Jahr. Diagnose: Pertussis, Brechdurchfall, Bronchopneumonie. Aus letzterer neben wenig *Lanceolatus* massenhaft *Bac. pertussis*. Auf Blutagar in 1 Generation fortgezüchtet.

3) Pahl, Franz, 5 Jahr. Diagnose: Pertussis, Enteritis, Bronchopneumoniae confluentes. Aus dem Saft der infiltrierten Partien *Bac. pertussis* in Reinkultur. 3 Generationen.

4) Bremer, 3 Jahr. Diagnose: Pertussis, Scarlatina, Bronchopneumonie. Aus letzterer *Bac. pertussis* in überwiegender Menge neben *Streptococcus pyogenes*. 2 Generationen.

5) Schiller, 1½ Jahr. Diagnose: Pertussis, Bronchopneumonie. Aus letzterer einzelne Kolonien von *Staphylococcus aureus* und massenhaft *Bac. pertussis*. 1 Generation.

6) Menthe, 3 Jahr. Pertussis, Bronchopneumonie. Aus letzterer neben einigen Staphylokokkenkolonien massenhaft *Bac. pertussis*. In der Umgebung der Streptokokkenkolonien bildet der *Bac. pertussis* „Riesenkolonien“. 2 Generationen.

7) Schate, Pertussis, Bronchopneumonie. Aus letzterer viel *Bac. pertussis* neben einigen Kolonien *Micrococcus catarrhalis* (Pfeiffer). 1 Generation.

8) Paust, Elisabeth, 4 Jahr. Pertussis, Otitis media duplex, Bronchopneumonie. Aus letzterer massenhaft *Bac. pertussis*. 3 Generationen.

9) Widmann, Pertussis, Bronchitis, Spasmus glottidis, Bronchopneumonie. Aus letzterer neben Streptokokkenkolonien massenhaft *Bacillus pertussis*. 4 Generationen.

10) Müller, Amandus, 7 Monate, Pertussis, *Renes cysticae* congenit. Bronchopneumonie. Aus letzterer massenhaft *Bac. pertussis* in Reinkultur. 2 Generationen.

11) Leise, Else, $\frac{1}{2}$ Jahr, Pertussis, Bronchopneumonie *lobi inferioris pulmonum*. Aus dem Parenchymsaft der infiltrierten Lungenbezirke viel *Bac. pertussis* neben einzelnen Streptokokkenkolonien, in deren Kolonien er „Riesenkolonien“ zeigt.

12) Schau, Carl, $\frac{1}{4}$ Jahr, Pertussis, Bronchopneumonie. Aus letzterer viel *Bacillus pertussis*. 2 Generationen.

13) Lesche, Amanda, 3 Jahr. Pertussis Bronchopneumonie. Aus letzterer viel *Bac. pertussis* neben einzelnen Streptokokkenkolonien.

14) Wendt, Ernst, $2\frac{1}{4}$ Jahr, Pertussis, Bronchopneumonie. Neben *Staphylococcus albus* aus dem Saft der letzteren viel *Bac. pertussis*. 2 Generationen. Etwas unregelmäßigere Formen als gewöhnlich.

15) Schmidt, Eduard, 1 Jahr. Pertussis, Bronchopneumonie. Aus letzterer neben einzelnen Streptokokkenkolonien massenhaft *Bac. pertussis*. 1 Generation.

16) Wange, Marie, $2\frac{1}{2}$ Jahr. Pertussis, Bronchopneumonie. Reinkultur von *Bac. pertussis* aus dem Parenchymsaft der infiltrierten Lunge. 3 Generationen. Etwas unregelmäßige Formen.

17) Busch, Elsa, 1 Jahr. Pertussis, Bronchopneumonie beider Unterlappen. *Bac. pertussis* in Reinkultur aus dem Parenchymsaft isoliert. 2 Generationen.

18) Koch, Ernst, $2\frac{1}{4}$ Jahr. Pertussis, Bronchopneumoniae. Aus letzterer neben einzelnen Streptokokkenkolonien massenhaft *Bac. pertussis*. 1 Generation.

19) Meyer, Rudolf, 3 Jahr. Pertussis, Tuberculosis peritonei et glandul mesent. Bronchopneumoniae. Aus letzterer Reinkultur von *Bac. pertussis*. Der Stamm zeigt unregelmäßige Formen, dünnere und plumpere Stäbchen wechseln ab. 2 Generationen.

20) Carstens, 5 Monate. Pertussis, Bronchitis, Gastroenteritis, Bronchopneumoniae Aus letzterer massenhaft *Bac. pertussis*. 3 Generationen.

Literatur.

- 1) Jochmann, Georg und Krause, Paul, Zur Aetiologie des Keuchhustens. (Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. XXXVI. 1901.)
- 2) Pfeiffer, R., Die Aetiologie der Influenza. (Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankh. Bd. XIII. 1893.)
- 3) Sawada, K., Virchows Archiv. Bd. CLXIX. 1902. p. 263.
- 4) Grassberger, R., Beiträge zur Bakteriologie der Influenza. (Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. XXV.)
- 5) Meunier, H., Dix cas de bronchopneumonies infantiles dues au bacille de Pfeiffer (Influenzabacillus). (Arch. génér. de méd. 1897. Février.)
- 6) Leiner, Karl, Ueber Influenza als Mischinfektion bei Diphtherie. (Wiener klin. Wochenschr. 1901. No. 41.)
- 7) Süßwein, J., Die Influenza bei Masern. (Wiener klin. Wochenschr. 1901. No. 47.)
- 8) Jehle, L., Ueber die Rolle der Influenza als Mischinfektion bei den exanthematischen Erkrankungen und das Vorkommen von Influenzabacillen im Blut. (Zeitschr. f. Heilkunde. Bd. XXII. 1901. Heft 5.)

Nachdruck verboten.

Die Bierhefe bei experimentell erzeugter Streptokokken- und Staphylokokkeninfektion.

[Aus dem Laboratorium der Academia de Ciencias médicas de Cataluña.]

Von Prof. Dr. **R. Turró, J. Tarruella** und Dr. **A. Presta**.

Aus dem Spanischen übertragen von Dr. Alfred Berliner, Berlin.

Zahlreiche klinische Beobachtungen, welche zwei von uns über die Behandlung der Staphylokokken- und Streptokokkeninfektionen mittelst Bierhefe gemacht und veröffentlicht¹⁾ haben, gaben den Anlaß zu vorliegender experimenteller Arbeit.

I. Tell.

a) Die Streptokokkeninfektionen.

Aus einer Eiterpustel wurde ein Streptococcus isoliert und nach dem Marmorekschen Verfahren seine Virulenz bis zu einem gewissen Grade gesteigert, alsdann ein Tropfen aus einer Bouillonkultur 6 Kaninchen von annähernd gleicher Größe, Färbung und Gewicht in die Ohrmuschel eingepfht. Nach 24 Stunden bereits gab sich eine deutliche Entzündung der Impfstelle zu erkennen, am markantesten, wenn man die Ohren im auffallenden oder durchfallenden Lichte betrachtete; bei gleichzeitigem Berühren beider Ohren war die lokale Temperatursteigerung gut abzuschätzen. 2 Kaninchen verbleiben als Kontrolltiere; die übrigen 4 erhalten jedes eine Einspritzung von 10 ccm *Saccharomyces cerevisiae* unter die Rückenhaut. Zur Verwendung kommt aus einer Münchener Stammkultur durch 6-tägige Züchtung in Malzbrühe erhaltene Hefe, nach Aspiration des Bodensatzes, woselbst die Kultur am dichtesten ist.

Drei Tage nach der Impfung: Es besteht kein bemerkenswerter Unterschied zwischen den 4 geimpften Tieren und den Kontrolltieren. Das Erysipel entwickelt sich bei allen durchgängig in gleicher Stärke; die Löffel hängen bereits herab, können jedoch von den Tieren selbständig wieder aufgerichtet werden. Die subkutane Hefeinjektion hat in situ anscheinend keine Reaktion erzeugt. Bei jedem der 4 Kaninchen wird an anderer Stelle die Hefeinjektion wiederholt, wiederum 10 ccm.

Vier Tage nach der Impfung: Sichtliches Fortschreiten des Erysipels bei den beiden Kontrolltieren: Es besteht deutliche teigigeröse Infiltration, die Haut schwillt an und ist feucht, die Ohrklappen sind völlig herabgesunken. Eines der Tiere weist bei Rektalmessung eine Temperatursteigerung von 1,7° über die Norm auf, das andere von 0,9°. Dagegen hat bei den 4 anderen Tieren die Entzündung gegen den vorangegangenen Tag kaum Fortschritte gemacht, die Hautdecken bleiben trocken, Oedem und Hyperämie sind anscheinend nicht so stark, die Ohren sinken spontan herab, können aber bei Berührungen aufge-

1) Tarruella, J. und Presta, A., Die Bierhefe in der Behandlung der Exanthemkrankungen sowie der Staphylokokken- und Streptokokkeninfektionen:

I. Mitteilung: Revista de Medicina y Cirugía. Juni 1901. No. 6.

II. Mitteilung: Revista Ibero-Americana 1902. No. 6—9.

richtet werden. Die Temperatur schwankt bei ihnen zwischen 0,3 und 0,8° über der Norm. Jedes Tier erhält wieder eine Injektion von 10 ccm Hefe.

Fünf Tage nach der Impfung: Intensives Erysipel bei beiden Kontrolltieren, das eine derselben läßt das Ohr nachschleifen, es sickert eine klare, gelbliche Flüssigkeit hervor; bei dem anderen ist die Schwellung nicht so beträchtlich, jedoch die fieberhafte Reaktion stärker; sie überschreitet die Norm um 1,9°, während sie bei seinem Genossen nur 1° über dem Normalen zeigt. Was die 4 mit 30 ccm Hefe behandelten Tiere anbelangt, so weisen sie eine unzweifelhafte Besserung auf: Ihre Ohren schwellen sichtlich ab, richten sich leicht auf, die Epidermis wird trocken und blättert ab; fast alle zeigen normale Temperatur. Nach 2-tägiger Zwischenpause erhalten sie wieder eine Injektion von 10 ccm.

Sieben Tage nach der Impfung: Das eine der Kontrollkaninchen zeigt ständiges Aussickern seröser Flüssigkeit, der innere Ohrtrand beginnt sich abzustößen, die Hautdecken sind nicht mehr so geschwollen wie zuvor. Bei dem zweiten Tiere beginnt das Erysipel abzuklingen, doch bleibt die Temperatur dauernd hoch, sie überschreitet noch 1,5° die Norm; das Tier frißt nicht und zeigt sich schläfrig. Die übrigen 4 können als geheilt gelten. Nach Ablauf von weiteren 4 Tagen erhalten sie noch 10 ccm Hefe injiziert, um die Heilung zu verbürgen.

Zehn Tage nach der Impfung: Einem der Kontrolltiere geht es besser; der äußere Ohrtrand beginnt zu vernarben unter Zurücklassung eines zackigen Saumes. Bei dem zweiten verschlimmert sich das Befinden, es stirbt am folgenden Tage, dem elften nach der Impfung, an allgemeiner Streptokokkeninfektion. Aus der serösen Flüssigkeit des Herzbeutels werden Reinkulturen des Mikroorganismus gezüchtet. Was die 4 mit Hefe behandelten Kaninchen anbelangt, so bieten sie keinerlei Zeichen einer Infektion mehr.

Injiziert man 4 oder 6 Tage hindurch Kaninchen je 10 ccm einer Bierhefekultur, so erlangen die Tiere eine Widerstandskraft gegen die Wirksamkeit des Streptococcus, derart, daß sie temporär immun gegen das infektiöse Agens erscheinen. Es wurden also 4 Kaninchen, die alles in allem 40—60 ccm Hefe erhalten halten, 2 Tropfen einer Streptokokkenkolonie eingimpft, während 2 Kontrolltiere nicht vorbehandelt waren. Bei den letzteren entwickelt sich ein Symptomenbild, analog dem oben beschriebenen, dagegen kommt von den 4 präventiv behandelten Kaninchen nur bei einem eine lokale Hyperämie ohne spätere Folgen zu stande, die drei anderen zeigen weder lokal noch allgemein irgendwelche bemerkenswerte Reaktion. Dieses refraktäre Verhalten ist jedoch nur ein vorübergehendes; wir sind außer stande, die Grenzen seiner Dauer weder nach oben noch nach unten hin zu bestimmen, da sie individuellen Schwankungen zu unterliegen scheint.

Die gleiche Widerstandskraft besteht gegenüber der intravenösen Einimpfung virulenter Streptokokkenkulturen: Während die Kontrolltiere einer Allgemeininfektion erliegen, zeigen Kaninchen nach Präventivbehandlung mit 40—60 ccm *Saccharomyces*-Kultur, wenn man täglich um 10 ccm successiv steigt, in der Mehrzahl keine Entwicklung einer Infektion, höchstens sehr abgeschwächt im Vergleich zu der typischen Infektion der Kontrolltiere.

b) Die Staphylokokkeninfektionen.

Unsere diesbezüglichen Versuche trugen mehr den Stempel des Zufälligen als die vorangegangenen: Einmal war der geringe Virulenzgrad des *Staphylococcus pyogenes aureus* oder *albus* die Ursache, daß nur ein lokaler Absceß entstand, der rasch zur Heilung kam, ohne daß man auch nur mit einiger Sicherheit die Wirkung der Bierhefe hätte erkennen können, ein andermal hatte die hohe Virulenz des Mikroorganismus eine so akute Septikämie zur Folge, daß die Heilkraft des Mittels nicht genau zu beurteilen war. Trotzdem fällt es, nach wiederholten Versuchen, nicht schwer, Kulturen des *Staphylococcus aureus* von einem mittleren Virulenzgrad zu erhalten, der weder in wenigen Tagen zum Tode führt, noch auch zu abgeschwächt ist, um nicht binnen 15—25 Tagen unter Bildung multipler Eiterherde den exitus letalis zu bewirken. Impft man eine bestimmte Dosis dieser Kulturen ein, sei es durch intravenöse Injektion, sei es in die Bauchhöhle, so bildet sich im ersten Falle eine Pyämie heraus, unter Entstehung multipler Abscesse der Bauchorgane, speziell in der Leber und den Nieren, im zweiten Falle kommt es zu einer eitrigen Peritonitis, deren Dauer nach der Beschaffenheit der Fälle wechselt. Die Heilkraft der Bierhefe, deren Anwendung, wie oben beschrieben, erfolgt, ist unbestreitbar aus dem Krankheitsverlauf der behandelten Kaninchen, verglichen mit dem der Kontrolltiere, zu erkennen. Tötet man ein behandeltes Tier und ein Kontrolltier zwischen dem 4. und 5. Tage, so ergeben sich sehr instruktive Bilder bei der Autopsie: Während bei dem ersten die Entzündungserscheinungen an den Baueingeweiden in Abnahme begriffen sind und die Eiteransammlung verringert und abgekapselt ist, sehen wir bei dem Kontrolltiere den Entzündungsprozeß immer weiter vordringen und viel reichlichere Eitermassen überall; zwischen dem 8. und 10. Tage kann man beobachten, daß der Eiter dicker und konsistenter geworden ist und daß sich deutliche Absorptionsvorgänge abspielen, die den Entzündungsprozeß abklingen lassen. Bei den Kontrolltieren dagegen tritt gerade das Gegenteil ein.

Die Präventivbehandlung von Kaninchen mittelst täglicher Hefeinjektionen aus Kulturen des *Saccharomyces cerevisiae* bedingt eine gewisse zeitliche Immunität oder größere Widerstandskraft gegen den *Staphylococcus pyogenes albus* und *aureus*. Impft man zwischen dem 6. und 7. Behandlungstage die Tiere subkutan mit einer gleichen Dosis derselben Kultur, so bilden sich bei dem Kontrolltiere Abscesse, bei den präventiv behandelten kommt es entweder gar nicht zu Veränderungen oder es bildet sich eine gutartige Entzündung, ohne daß wir je eine Vereiterung beobachtet hätten.

II. Teil.

Die soeben geschilderten Versuche zeigen uns bei einem Vergleich mit den klinischen Beobachtungen, über die wir ausführlich in den beiden oben genannten Mitteilungen berichtet haben, daß die Heilwirkung der Hefe beim Kaninchen langsamer eintritt als beim Menschen, vielleicht trägt daran der Umstand Schuld, daß bei letzterem die Einfuhr des Mittels durch den Verdauungstraktus erfolgt, beim Kaninchen auf hypodermatischem Wege. Bei der Behandlung der Furunkulose, der Phlegmonen, des Erysipels, der Blattern während ihrer Periode der Eiterbildung tritt rasche Heilung nach Beginn der Be-

handlung ein, desgleichen sind bei Masern, Scharlach u. s. w. die Wirkungen der Hefe deutlich zwischen dem 2. und 3. Tage erkennbar. Bei den Pocken läßt sich im Stadium seröser Blasenbildung durch rechtzeitige Anwendung der Hefe der Uebergang in das Stadium der Pustelbildung vermeiden. Beim Kaninchen hingegen erfolgt die Wirkung langsamer, erst zwischen dem 4. und 5. Tage; sie ist jedoch nicht veranlaßt durch lösliche Stoffe, die die Hefe in ihrem Kulturmedium hinterläßt. Filtriert man nämlich unter Druck die Flüssigkeit aufs genaueste, so übt sie keinerlei Heilkraft mehr aus; dagegen wirken die Hefezellen, auch wenn man sie zweimal in destilliertem Wasser wäscht, noch immer in gleicher Weise. Diese Tatsache beweist zur Evidenz, daß das wirksame Prinzip im Protoplasma des *Saccharomyces* wurzelt und erst in gelöstem Zustande in die Erscheinung tritt, sobald es ungehindert in den Organismus übergehen kann.

Nach Injektion von Hefekulturen in das Unterhautzellgewebe kommt es zu einer „aktiven“ Hyperämie mit seröser Exsudation und reichlicher Auswanderung weißer Blutkörperchen; von letzteren werden die Hefezellen eingekapselt, aufgelöst und schließlich verdaut. Die frei in der Lymphe umherschwimmenden Zellen werden von dieser angegriffen, zeigen fortschreitende Vakuolenbildung, bis sich ihr Protoplasma in eine durchscheinende Masse verwandelt, die weder mit sauren noch basischen Farbstoffen tingierbar ist; schließlich verschwinden sie ganz. Dieses Phänomen ist völlig identisch mit den von dem einen von uns¹⁾ beschriebenen Vorgängen bei der Einwirkung des Schilddrüsen-, Muskel- und Nierensaftes auf den Milzbrandbacillus. Desgleichen hat Duclome²⁾ derartige Vorgänge von Zellauflösungen nach Injektionen in die Bauchhöhle beschrieben, wobei sie jedoch rascher verlaufen. Dadurch, daß das wirksame Prinzip im Protoplasma der Hefezellen frei wird und in Lösung geht, erwirbt das Blutserum der Kaninchen eine Eigenschaft, die es normalerweise nicht besitzt, nämlich auf Streptokokken sowie auf *Staphylococcus aureus* und *albus* agglutinierend zu wirken; nur auf diese Bakterien erstreckten sich unsere Versuche. Diese Eigenschaft wird um so ausgesprochener, je weiter die Behandlung fortschreitet.

Die Agglutination des *Streptococcus* und *Staphylococcus* bleibt ebenso deutlich bei Anwendung von Hefekulturen in Rinderbouillon oder in der Würze des Darmmalzes, wie es zur Fabrikation des Bieres benutzt wird. In kaum 24 Stunden ist der Prozeß schon ganz deutlich. Bei dem *Streptococcus* tritt sogar die Agglutination so rasch auf wie beim B. Eberth nach Zufügung des agglutinierenden Tropfens zwischen Objektträger und Deckgläschen.

„In vitro“ sieht man die nicht mehr keimfähigen Streptokokkenverbände sich zu Klumpen an den Wänden des Reagensröhrchens zusammenballen; allmählich senken sie sich zu Boden unter gleichmäßiger Verteilung, ohne die Flüssigkeit zu trüben. Die Agglutination erfolgt schon nach Zusatz weniger Tropfen der Hefekultur.

Die agglutinierende Substanz der *Saccharomyces*-Kulturen scheint ihrer Natur nach den Enzymen anzugehören; durch Erwärmung auf 55° verliert sie ihre Wirksamkeit, in alten Kulturen schon bei 45°. Wahr-

1) Turró, R., Zur Bakterienverdauung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXII. 1902. No. 2.)

2) Duclome, *Traité de microbiologie*. Bd. III. Cap. XXXVI.

scheinlich stellt das von Duclaux beschriebene Phänomen der „Selbstverdauung“ in alten Hefekulturen eine Auflösung der Protoplasmasubstanz in der Flüssigkeit dar; das Protoplasma enthält die agglutinierende Materie, deren Wirksamkeit sich schon in 48-stündigen Kulturen einstellt und nach Erwärmung bis zur Gerinnung aufhört.

Legt man eine Kultur des Streptococcus und der Hefe in demselben Medium an, so läßt sich folgendes beobachten: Erstlich entwickelt sich der Streptococcus bereits in agglutiniertes Form oder in Knäuelform, zweitens verliert er rasch die Eigenschaft, auf Gelose oder Gelatine übertragen, weiter zu wachsen; endlich schwächt sich seine Virulenz rascher ab als auf den gewöhnlichen Kulturmedien.

Das Verschwinden der Virulenz des Staphylococcus aureus und albus bei gemeinschaftlichem Wachstum mit dem Saccharomyces-Pilz läßt sich gleichfalls als untrügliches Faktum durch Vergleich mit Kontrollversuchen nachweisen.

Aus der oben angedeuteten Versuchsreihe glauben wir zwar nicht den Schluß ziehen zu können, daß mit dem noch so dunklen Phänomen der Agglutination die Heilwirkung der Hefe bei Streptokokken- und Staphylokokkeninfektionen genügend aufgeklärt ist, sondern wir wollen nur damit feststellen, daß die Eigenschaften dieser Bakterien-gattungen in Gegenwart der Hefe eine tiefgreifende Aenderung erfahren. Wenn wir ein Mittel besäßen, das Protoplasma der Hefezellen löslich zu machen, so würde vielleicht der Nachweis gelingen, daß gegenüber den genannten Bakterienarten, wenigstens in vitro, das Protoplasma ein mächtiges Antiseptikum darstellt; so aber müssen wir uns begnügen, diese Behauptung auf indirektem Wege nachzuweisen.

So konnten wir beispielsweise bei einer eitrigen Erkrankung des Warzenfortsatzes folgende Beobachtung machen: Am 4. Tage der Bierhefebehandlung — zu der wir uns berechtigt halten, auf Grund zahlreicher klinischer Beobachtungen in allen Fällen, wo ätiologisch Staphylokokken oder Streptokokken nachweisbar sind — war eine Geloseaussaat des Eiters gemacht worden, versehentlich nicht zu Beginn der Kur. Tags darauf fanden wir das Geloseröhrchen völlig steril, obwohl es mit einer genügenden Quantität Eiter beschickt worden war. Von diesem Röhrchen impften wir mit der Nadel auf ein zweites über und sahen nach 24 Stunden typische, isolierte Kulturen des Staphylococcus aureus aufgehen. Dieser unerwartete Ausgang des Versuches führte uns dazu, ihn in anderen Fällen zu wiederholen, und konstant konnten wir die Beobachtung bestätigen, daß Eiter, im Ueberschuß ausgesät, das Aufgehen der Kolonien sowohl des Streptococcus wie des Staphylococcus verzögert, und daß die Zahl der Kolonien sich verringert, in gleichem Maße, wie die Behandlung fortschreitet; nicht selten trifft man nach 10 oder 12 Tagen auf sterilen Eiter. Streptokokken, die von Kaninchen stammen, welche eine Hefebehandlung durchgemacht haben, verlieren die Fähigkeit, sich auf den gewöhnlichen Kulturmedien fortzupflanzen und zeigen rasche Abschwächung ihrer Virulenz; auch die Staphylokokken schwächen sich ab, ohne jedoch die Fortpflanzungsfähigkeit einzubüßen.

Aus diesen Beobachtungen lassen sich folgende Schlüsse ableiten:

1) Der Eiter von Individuen, die mit Bierhefe behandelt sind, enthält eine Substanz, welche die Keimfähigkeit der betreffenden Bakterien-spezies hindert, indem sie nach Art eines Antiseptikums wirkt.

2) Diese Substanz wirkt bakterizid gegen die betreffenden Bakterienarten, denn die Zahl der Keime verringert sich von Tag zu Tag.

3) Die Substanz schwächt auch die Virulenz der Keime ab. Demzufolge müssen wir im Protoplasma der *Saccharomyces*-Zellen wirksame Prinzipien oder Substanzen annehmen, die der Keimfähigkeit der Staphylokokken und Streptokokken entgegenwirken, indem sie gleichzeitig ihren Virulenzgrad abschwächen und sie selbst vernichten, vorausgesetzt daß diese Stoffe gelöst sind und sich in dem Lösungsmittel verbreiten können. Die verdauende Tätigkeit der Leukocyten gibt uns einen Fingerzeig, wie die Lösung dieser Substanzen vor sich geht, sobald sie auf hypodermatischem Wege in den Organismus übergehen. Im übrigen, wenn man die Bierhefe durch den Digestionstraktus einverleibt, geht die Verdauung ihrer Zellen auf ganz andere Weise vor sich: Hochwertige Pepsinlösungen üben keine Wirkung auf die Zellen aus, ebenso werden sie von Pankreaslösungen, die nach Heidenhain'scher Methode hergestellt sind, wenig beeinflußt; auch der direkt aus dem *Ductus Wirsungianus* gewonnene Pankreassaft ist wirkungslos. Lediglich der durch Selbstverdauung des Pankreas¹⁾ erhaltene Saft scheint einigermaßen auf die Hefezellen einzuwirken, und auch dieser nur langsam. Wie werden sie also im Digestionsapparate verdaut? Wahrscheinlich ist dabei die Bakterienflora des Darmkanals im Spiele, die in gleicher Weise auf sie wie auf zellulosehaltige Substanzen einwirkt. Wir stellten nun folgenden Versuch an: Hundert Kolben mit Malzbrühe, die mit *Saccharomyces*-Pilzen besickt waren, wurden mit menschlichen Exkrementen geimpft. Natürlich entwickelten sich die verschiedenartigsten Bakterien, doch so, daß einige Spezies überwogen. Die methodische Untersuchung dieser Kulturen ergab nun zur Evidenz, daß die Zahl der Hefezellen in 60 Proz. der Proben auf weniger als die Hälfte zurückgegangen war, in 30 Proz. waren sie fast völlig verschwunden.

Es lag schließlich in unserer Absicht, einige Spezies, die eine besonders intensiv verdauende Kraft auf die Hefezellen auszuüben schienen, zu isolieren, jedoch sind unsere diesbezüglichen Beobachtungen für eine Veröffentlichung noch nicht genügend spruchreif.

Immerhin scheint uns die Tatsache, daß die Hefezellen unter der Einwirkung der Darmbakterien verschwinden, einiges Licht zu verbreiten über den Mechanismus, welcher die Lösung und Assimilierung der im Protoplasma der Bierhefe enthaltenen streptokokken- und staphylokokkenfeindlichen Prinzipien vermittelt.

Schlußfolgerungen:

I. Die Bierhefe übt bei experimenteller Anwendung eine deutliche Heilwirkung gegenüber einer Streptokokkeninfektion des Kaninchens aus, sowohl bei lokaler wie Allgemeinerkrankung; die Anwendung erfolgt subkutan in Dosen von 10 ccm aus einer gut entwickelten Kultur; sie ist 5 Tage mindestens, 12 Tage in maximo zu wiederholen. Die gleichen Verhältnisse herrschen bei der Staphylokokkeninfektion.

1) Pi y Sunger, A., Sociedad de Biología. Barcelona 1902.

II. Nach Subkutaninjektion von 10 ccm Bierhefe 4—6 Tage hindurch erzielt man beim Kaninchen eine temporäre Immunität gegen experimentell erzeugte Streptokokken- und Staphylokokkeninfektion.

III. Das wirksame Prinzip des *Saccharomyces cerevisiae* ist nicht in seiner Kulturflüssigkeit enthalten; es wurzelt im Zellprotoplasma und tritt in Tätigkeit, sobald es durch vorhergehende Verdauung seitens der Leukocyten der Körperlymphe gelöst ist.

IV. Das Blutserum der mit Hefe behandelten Kaninchen zeigt agglutinierende Eigenschaften gegenüber dem *Streptococcus* und *Staphylococcus aureus* und *albus*.

V. Mit Hefe beschickte Rinderbouillon oder Malzbrühe wirken vom 2. Tage an agglutinierend auf die genannten Bakterienarten; bei der Erwärmung auf 55° erlischt diese Eigenschaft.

VI. In dem Eiter eines mit Bierhefe behandelten Individuums verringert sich die Zahl der pyogenen Keime, je länger die Behandlung dauert; der Eiter wird schließlich steril, gleichzeitig nimmt der Virulenzgrad immer mehr ab.

VII. Das wirksame Prinzip der per os aufgenommenen Bierhefe wird löslich und assimilationsfähig unter der verdauenden Wirkung gewisser Bakterienarten der Darmflora, die noch nicht genau bestimmt sind.

Nachdruck verboten.

Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen.

Von C. O. Jensen,

Prof. an der tierärztlichen und landwirtschaftlichen Hochschule zu Kopenhagen.

Mit 4 Tafeln.

Nachdem das Wesen der ansteckenden Krankheiten jetzt in den Hauptstücken klargelegt worden ist, hat die pathologische Forschung sich mit Eifer auf die Fragen nach der Aetiologie und Genese der bösartigen Geschwülste geworfen; und die wichtigen Entdeckungen der jüngsten Jahre auf dem Gebiete der Immunitätslehre, besonders der Nachweis von Hämolytinen, Cytotoxinen und Präcipitinen, im Verein mit der hierdurch erregten Hoffnung, auf dem hier betretenen Wege nun auch wirksame Mittel gegen die Krebskrankheit zu finden, haben diesen Bestrebungen einen mächtigen Stoß vorwärts gegeben. Betrachtet man das Ergebnis der zahlreichen und umfassenden Arbeiten, so muß man indes eingestehen, daß dasselbe nur ein dürftiges ist. Wir wissen jetzt nicht mehr als vor 20 Jahren über die ursächlichen Verhältnisse der malignen Tumoren.

Anhänger der Theorie von der parasitären Entstehung der Geschwülste haben öfters behauptet, man werde vermutlich schon allein durch die Entwicklung der mikroskopischen Technik und durch umfassende genaue mikroskopische Untersuchungen zur Klarlegung der ursächlichen Verhältnisse des Cancers gelangen können, indem sie auf die eingehende Kenntnis der Entstehungsursachen der Malariakrank-

heiten hinwiesen, die man fast einzig und allein auf diesem Wege erworben hat. Es läßt sich wohl nicht bestreiten, daß eine entwickelte mikroskopische Technik uns auch auf diesem Gebiete wird vorwärts bringen können; die zahlreichen bis jetzt vorliegenden Untersuchungen warnen uns aber, allzu fest darauf zu vertrauen, daß es uns auf diesem Wege gelingen sollte, die Frage nach der Aetiologie und Pathogenese der Geschwülste zu lösen. Es kommt mir als höchst wahrscheinlich vor, daß man, um Klarheit nicht nur über die ursächlichen Verhältnisse, sondern auch über eine Reihe anderer, noch nicht gelöster Fragen mit Bezug auf die Pathogenese und die übrigen Verhältnisse der Geschwülste zu erlangen, seine Zuflucht zur experimentellen Forschung nehmen muß. Dies ist jedoch nicht so zu verstehen, als ob man diesen Weg nicht schon früher eingeschlagen hätte; im Gegenteil, es liegen nicht nur aus den letzten Jahren, sondern auch aus früherer Zeit sogar recht umfassende Versuche vor, speziell über die Möglichkeit einer Uebertragung der Geschwülste von Individuum auf Individuum. Die Resultate dieser Versuche waren im großen und ganzen jedoch nur wenig befriedigend und wesentlich negativen Charakters, indem es sich äußerst schwierig erwiesen hat, ein Material zu beschaffen, das sich überhaupt für solche experimentelle Forschung eignete. Weit aus die meisten Sarkome und Carcinome lassen sich bekanntlich nur äußerst schwierig auf andere Individuen übertragen, und selbst wenn dies bei einem einzelnen der geimpften Tiere gelingt, ist es selbstverständlich, daß man nicht im stande ist, aus einzelnen derartigen Versuchen weitergehende Schlüsse zu ziehen.

Um zu größerer Klarheit zu gelangen, muß man solche Geschwulstformen aufsuchen, die sich mit Leichtigkeit auf andere Individuen übertragen lassen, und zwar am liebsten bei kleineren Versuchstieren, die in so großer Anzahl, wie erforderlich ist, herbeigeschafft werden können, speziell also bei Ratten und Mäusen. Es liegen nun auch Beobachtungen über Geschwülste bei diesen Tieren vor, die sich mit größerer oder geringerer Leichtigkeit auf andere Individuen derselben Gattung transplantieren ließen; so verweise ich auf Hanaus (1) Transplantation eines unzweifelhaften Hautcarcinoms einer Ratte, auf Moraus (2) zahlreiche Uebertragungen des Adenocarcinoms einer weißen Maus und auf Loeb's (3) und Velich's (4) Rattensarkome.

Ich selbst habe eine längere Reihe von Jahren hindurch solchen Geschwülsten nachgespürt und nach und nach mehrere Mäuse mit carcinomatösen Tumoren gefunden, eine Uebertragung derselben auf andere Mäuse gelang aber nicht. Erst vor reichlich 2 Jahren kam ich in Besitz eines solchen transplantablen Tumors einer weißen Maus, die einst mit Melanosarkomzellen eines Pferdes geimpft worden war und, von dieser Impfung unabhängig, eine ca. haselnußgroße Geschwulst am Rücken bekam, welche an die Haut adhärent war und ihren Ausgang offenbar aus dieser genommen hatte, sich aber zugleich abwärts erstreckte und ihren wesentlichsten Sitz im subkutanen Gewebe hatte. Diese Geschwulst ließ sich auf andere Mäuse übertragen, indem sich bei 3 unter 5 geimpften Mäusen Tumoren von ganz ähnlicher Beschaffenheit wie bei der ersten entwickelten, und aus diesen Mäusen gelang es mir später, durch fortgesetzte Impfung die Geschwulst auf eine sehr große Anzahl anderer Mäuse zu übertragen. Im Dezember 1901 gab ich in einem Vortrag in der Biologischen Gesellschaft (zu Kopenhagen) (5, 7) eine kurz gefaßte Uebersicht über die damals vorliegenden Resultate; so konnte ich mitteilen, daß es gelungen sei, die Geschwulst durch 8 Gene-

rationen hindurch von Maus auf Maus zu transplantieren, daß es nicht geglückt sei, das Vorhandensein von Schmarotzern im Geschwulstgewebe zu konstatieren, und daß einige Versuche in betreff der Widerstandsfähigkeit der Zellen angestellt worden seien. Ueber letzteren Punkt gab ich später im April 1902 an demselben Orte (6) eine mehr umfassende Uebersicht. Endlich teilte ich in meinem ersteren Vortrage das Ergebnis einiger Heilungsversuche ausführlich mit, indem ich anführte, daß ich ein Kaninchen mit steigenden Mengen zerstoßener Cancermasse geimpft hätte, und daß das Blutserum dieses Kaninchens sich im Besitze heilender Eigenschaften gezeigt habe, so daß einige Mäuse mit ziemlich großen Geschwülsten durch Behandlung mit demselben völlig geheilt worden wären, indem die Geschwülste einschrumpften und resorbiert worden seien.

Seitdem habe ich die Versuche in verhältnismäßig großem Maßstabe in vielen verschiedenen Richtungen fortgesetzt. Mehrere dieser Versuchsreihen sind beendet oder wenigstens zum vorläufigen Abschluß gebracht worden, und im folgenden werde ich nach einer Schilderung der größeren Verhältnisse und des histiologischen Baues der Geschwulst Versuche ausführlich besprechen, die angestellt sind, um die biologischen Verhältnisse der Geschwulstzellen aufzuklären. Dagegen sind die Versuche über das Vorkommen einer natürlichen Immunität und die Möglichkeit der Erzeugung einer künstlichen Immunität bei den Mäusen noch nicht abgeschlossen, was auch von den Heilungsversuchen gilt.

Hinsichtlich der letzteren hebe ich jedoch schon hier folgendes hervor: Unsere Bemühungen bezwecken ja das Auffinden eines Mittels gegen den Krebs, das nicht nur die lokale Behandlung der Geschwulst gestattet, sondern auch auf den ganzen Organismus universelle Einwirkung hat, mithin auch auf eventuell vorhandene Metastasen — eines Mittels, welches die weitere Verbreitung des Leidens im Organismus verhindern und auf die Geschwulstkrankheit, wo diese sich auch lokalisiert haben möchte, heilend wirken könnte. Abgesehen von den im wesentlichsten verlassenen Versuchen, dieses Resultat durch Bakterien oder Bakterienprodukte zu erzielen, erblicken wir für den Augenblick nur zwei Wege:

Wir können versuchen, eine aktive Immunität bei dem Patienten dadurch hervorzurufen, daß wir ihn mit seinen eigenen Geschwulstzellen behandeln, so daß sich im Blute Stoffe (Cytotoxine) bilden, welche die fernere Verbreitung der Geschwulstzellen, eventuell auch deren fortgesetztes Leben und Wachstum an der primär angegriffenen Stelle verhindern. Meines Wissens liegen in der Literatur nur Mitteilungen von v. Leyden und Blumenthal (8) über ein paar derartige Versuche an Menschen vor, das Resultat läßt sich aber nicht zur Entscheidung über die Brauchbarkeit der Methode verwerten. Meine an Mäusen angestellten Versuche in dieser Richtung, deren Anzahl freilich nur noch gering ist, deuten darauf hin, daß es nicht nur möglich ist, bei gesunden Mäusen eine aktive Immunität den Geschwulstzellen gegenüber hervorzurufen, sondern daß es auch möglich ist, bei einer bereits von einem Tumor angegriffenen Maus eine aktive Immunität durch Behandlung mit losgetrennten Geschwulstzellen zu erzeugen, so daß das fortgesetzte Wachstum der Geschwulst verhindert und das Geschwulstgewebe nach und nach getötet und resorbiert wird.

Der andere Weg, den wir einschlagen können, ist der, dem Pa-

tienten dadurch eine passive Immunität beizubringen, daß wir ihn mit einem Immunserum behandeln, welches mittels fortgesetzter Einimpfung von Geschwulstmaterial auf ein anderes Tier dargestellt wurde. Es liegen, wie in meiner vorläufigen Mitteilung berührt, ziemlich zahlreiche Versuche am Menschen in dieser Richtung vor, durchweg jedoch nur Versuche von sehr geringem Werte. Was ich in meinem ersten Vortrage über die Serumbehandlung von Mäusen mit Krebsgeschwülsten äußerte, kann ich in allem Wesentlichen festhalten; es scheint indes mit gewissen Schwierigkeiten verbunden zu sein, ein solches Heilserum herzustellen, und die Resultate waren bisher noch unsicher (d. h. bisweilen überraschend gut, bisweilen aber auch vollständig negativ), weshalb ich die nähere Besprechung dieser Versuche aufschiebe, bis ich größere Klarheit und zuverlässigere Resultate erlangt haben werde.

Gleich nach Veröffentlichung meines ersten Vortrags wurde derselbe in verschiedenen Tagesblättern referiert, und aus diesen fand der Inhalt den Weg nach dem Auslande. Mehrere der Blätter gaben ein unrichtiges Referat, und speziell wurde meinen Versuchen gar zu große Tragweite beigelegt, so daß es den Anschein erhielt, als ob ein Mittel gefunden wäre, welches sich auf angegriffene Menschen anwenden ließe. Da es wohl nicht zu vermeiden ist, daß auch diese ausführliche Mitteilung in den Blättern besprochen wird, sehe ich mich zu folgender Äußerung veranlaßt: Selbst wenn es gelingen sollte, ein Serum mit absolut heilender Wirkung auf Geschwulstformen bei Mäusen darzustellen, oder selbst wenn es gelingen sollte, auf die oben erwähnte Weise eine aktive Immunität gegen die Geschwulst zu erzeugen, dürfen wir darum doch nicht ohne weiteres feststellen, wir hätten sichere Mittel zur Behandlung der Krebskrankheit beim Menschen gefunden, da es in hohem Grade übereilt sein würde, aus Versuchen an kleinen Tieren in dieser Richtung Folgerungen rücksichtlich des Menschen zu ziehen. Ich glaube nicht, daß wir vorläufig große Hoffnung auf die Serumbehandlung der Krebskrankheit beim Menschen setzen dürfen. Die Darstellung eines solchen Serums wird nämlich äußerst schwierig fallen, und es wird nichts weniger als leicht sein, geeignetes und hinlängliches Impfmateriale für die Serumtiere zu beschaffen; ferner wird man sich nicht mit einem einzelnen Serum begnügen können, sondern muß wahrscheinlich eine große Reihe von Sera gegen die einzelnen Formen des Krebses haben. Hierzu kommt überdies, daß alle bisher dargestellten Cytotoxine (mit Ausnahme der Hämolysine) nur geringe Wirkung besitzen, so daß diejenige Menge Serums, die in den Organismus eingeführt werden muß, um die spezifische Wirkung zu erzeugen, eine unverhältnismäßig große wird. Hiermit ist nicht gesagt, daß mir die Arbeit in dieser Richtung hoffnungslos erscheinen sollte; im Gegenteil, die Arbeiten der letzteren Jahre auf den Gebieten der Bakterien- und Zellenimmunität haben uns so viele Ueberraschungen bereitet, daß ein wirksames Cancer serum nicht als ein Unerreichbares betrachtet werden kann, und überdies steht uns für den Augenblick wohl kein anderer gangbarer Weg offen; nur darf man nicht sogleich gar zu große Erwartungen und Hoffnungen hegen. Wir haben gewiß noch einen weiten und mühevollen Weg bis zum Ziel, und unsere bisherige Kenntnis der Cytotoxine ist noch sehr gering.

Die Mitteilungen, die ich im folgenden geben werde, betreffen teils den Bau der Geschwulst, mit welcher ich arbeitete, teils die Versuche,

dieselbe auf andere Mäuse wie auch auf andere Tierarten zu übertragen, ferner die wichtigen Fragen nach der parasitären oder nichtparasitären Entstehung der Geschwulst und nach dem Vorkommen der Immunität bei den Mäusen gegen die Geschwulstzellen. Endlich werde ich eine Uebersicht über die biologischen Verhältnisse der Geschwulstzellen geben: über ihre Lebensfähigkeit (*Vita propria*), nachdem sie aus der Verbindung mit dem angegriffenen Organismus getrennt sind, und ihre Widerstandsfähigkeit gegen eine Reihe äußerer Einwirkungen wie Wärme, Kälte, Licht, Eintrocknung und Antiseptica.

Das Vorkommen bösartiger Geschwülste bei Mäusen.

Ueber das Vorkommen von Geschwülsten bei Mäusen liegen sonderbarerweise, wenn man die ungeheure Anzahl von Mäusen bedenkt, die heutzutage in den Laboratorien benutzt werden, nur verhältnismäßig wenige Mitteilungen vor. Livingood (9) hat in einer kleinen Arbeit 5 Fälle von Geschwülsten bei weißen und grauen Mäusen beschrieben, nämlich ein Adenocarcinom in der Lunge einer weißen Maus, ein Adenocarcinom im subkutanen Gewebe, ebenfalls bei einer weißen Maus — dieser Tumor rezidierte nach Exstirpation und verursachte Metastasierung nach der Lunge — ferner ein vom Vorderbeine einer weißen Maus ausgehendes Adenocarcinom, gleichfalls mit Metastasen in der Lunge, ein Adenocarcinom aus der Axilla einer grauen Maus und endlich ein Adenom, das von der Haut am Beine einer grauen Maus ausging.

Loeb (3a) berührt in Kürze das Vorkommen eines Carcinoms bei einer weißen Maus.

Morau (2) endlich fand bei einer weißen Maus ein Adenocarcinom, dessen Uebertragung von Tier auf Tier ihm 5 Jahre hindurch gelang. Die Geschwülste der einzelnen geimpften Tiere boten im wesentlichen denselben mikroskopischen Bau dar wie die ursprüngliche Geschwulst, wengleich bei einigen Tieren kleine Verschiedenheiten anzutreffen waren. Die Geschwulst veranlaßte keine Metastasenbildungen; nach partieller Exstirpation entstanden indes Rezidive, zuweilen mit stärkerer subkutaner Verbreitung.

Ganz neulich (während der Korrektur) hat Borrel (10b) ein metastasierendes Adenocarcinom beschrieben, welches sich auf andere Mäuse transplantieren ließ; ein positives Resultat wurde allerdings nur bei ca. 10 Proz. der geimpften Tiere erreicht.

Ich selbst habe im Laufe der Jahre mehrere Fälle von Carcinomen bei Mäusen untersucht; so fand ich in der Haut und Subkutis einer weißen Maus eine Reihe erbsengroßer Tumoren, die sich bei mikroskopischer Untersuchung wie Plattenzellencarcinome gebaut erwiesen. Metastasen fanden sich nicht. Bei einer anderen weißen Maus fand ich an einem Hinterbein eine reichlich haselnußgroße Geschwulst, die unter dem Mikroskop einen adenocarcinomatösen Bau mit kleinen cystischen Höhlen zeigte. Es bot sich mir die Gelegenheit, noch ein paar andere Geschwülste zu untersuchen, über deren Verhältnisse ich jedoch keine näheren Aufzeichnungen gemacht habe. Transplantationsversuche mit den hier genannten Tumoren mißlangen.

Hierzu kommt die Geschwulstform, die ich im folgenden näher besprechen werde, und die ich bei meinen Arbeiten benutzte. Es könnte vielleicht sogleich die Frage erhoben werden: Spricht die Leichtigkeit, mit welcher Moraus Adenocarcinom und meine Geschwulst sich auf andere Individuen übertragen ließen, wie auch der Mangel an Metastasen-

bildung nicht entschieden gegen die Diagnose Carcinom? An diesem Orte verweise ich nur darauf, daß die von Hanau bei einer Ratte gefundene Geschwulst, die ja ohne Zweifel als ein Plattenzellencarcinom aufzufassen ist, da sie nämlich von Verhornungsprozessen begleitet war, sich ebenfalls mit Leichtigkeit auf andere Individuen transplantieren ließ, und daß der Mangel an Metastasenbildung ja auch gewissen Krebsgeschwülsten des Menschen eigentümlich ist.

Der Bau der Geschwulst.

Die ursprüngliche Geschwulst erwies sich als ein ca. haselnußgroßer, unter der Haut gelegener und an diese stark adhärenter Tumor. Das Geschwulstgewebe war von heller, weißgelblicher Farbe; an den Schnittflächen fanden sich einige ganz kleine, noch hellere Flecke, die augenscheinlich von Degeneration und Zerfall herrührten. Die Konsistenz war ziemlich weich, das Stroma des Bindegewebes augenscheinlich spärlich. Die Geschwulst war von einer ziemlich gefäßreichen Bindegewebsmasse umgeben; die nahe gelegenen Glandeln waren angeschwollen, zusehends aber nicht angegriffen. Von dieser Maus wurde Impfung auf 5 andere Mäuse unternommen auf folgende Weise:

Ein Teil der Geschwulst wurde in einem Mörser zerstoßen, mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gemischt, und ein wenig dieser Flüssigkeit wurde den Mäusen subkutan eingespritzt. Wie oben genannt, erschienen bei drei der auf diese Weise geimpften Tiere subkutane Geschwülste, die sich hinsichtlich ihres Baues in allem Wesentlichen ebenso wie die primäre Geschwulst verhielten. Die ursprüngliche Geschwulst wurde sogleich einer oberflächlichen Untersuchung unterworfen, welche die Diagnose Carcinom ergab. Leider ging der Rest dieses Tumors zu Grunde, indem die Formalinlösung, in welcher derselbe aufbewahrt wurde, verdampfte, so daß eine später angestellte Untersuchung keine so genauen Resultate gab, wie man hätte wünschen mögen. Die Geschwulst war, wie gesagt, an die Haut adhärent, und es ist wahrscheinlich, daß sie ursprünglich von den Hautdrüsen oder vielleicht von der Epidermis selbst ausgegangen war; der schlechte Konservierungszustand des Materials gestattete aber nicht, einen unumstößlichen Beweis zu führen, daß dies sich wirklich so verhielt. Die mikroskopische Untersuchung der ursprünglichen Geschwulst zeigt, soweit sich aus der ziemlich übeln Beschaffenheit des Gewebes schließen läßt, einen typisch carcinomatösen Bau. Dagegen wurden die Geschwülste der 3 obengenannten Mäuse zum Gegenstand einer genauen mikroskopischen Untersuchung gemacht. Sie scheinen sich, histologisch betrachtet, in allem Wesentlichen ebenso wie die ursprüngliche Geschwulst zu verhalten und unterscheiden sich in ihrem Bau in keiner Beziehung von denjenigen Geschwülsten, welche wir später durch fortgesetzte Impfung von Tier auf Tier erzeugten oder welche wir noch jetzt nach Verlauf von zwei Jahren durch Transplantation erregen; die Geschwulst scheint mit anderen Worten trotz der unablässigen Uebertragung von Individuum auf Individuum im Verlaufe der beiden Jahre ihren Charakter nicht verändert zu haben.

Nach Einimpfung von Geschwulstteilen einer Maus in das subkutane Bindegewebe einer anderen Maus entsteht nach Verlauf kürzerer oder längerer Zeit, gewöhnlich nach 14 Tagen, ein kleines Knötchen, das in der Regel lose, in der Subkutis ein wenig verschiebbar liegt. Dieses wächst mit verschiedener Geschwindigkeit an. Es kann im Laufe einiger

Monate ganz langsam an Größe zunehmen, so daß es nur die Größe einer Bohne oder einer Haselnuß erreicht, in weitaus den meisten Fällen hat es aber während des genannten Zeitraums eine Größe erreicht, die zwischen der einer halben Walnuß und der eines halben Hühnereies schwankt, und ein Gewicht, das bis auf 15—20 g ansteigen kann (Taf. I. Fig. 1 u. 2).

Betrachtet man die kleineren Geschwülste, so findet man sie von einer gewöhnlich gefäßreichen, ziemlich dünnen Bindegewebsmembran umgeben; das Gewebe ist meistens gleichförmig ohne makroskopische Zerfallsprodukte, von grauweißem feuchtem Aussehen. Die größeren Geschwülste können sowohl nach der Haut als nach dem unterliegenden Gewebe völlig verschiebbar sein, können andererseits aber auch sekundär auf die Haut übergreifen, diese so durchwachsen, daß Ulcerationsprozesse entstehen. Aeltere Geschwülste bieten häufig ein grobes, lappiges Außere dar, sie sind meistens von einem mehr oder weniger hämorrhagischen Oedem umgeben und ebenso wie die kleineren durch ein Bindegewebshäutchen gegen die Umgebungen abgegrenzt. Die Farbe ist je nach der Blutfülle bald rötlich, bald heller, grauweiß oder gelblichweiß; an den Schnittflächen sieht man nur spärliches Bindegewebe, hie und da Gefäße und Injektionsröte; das Gewebe ist sonst einigermaßen fest mit gesprenkelten weißen Zerfallsflecken. Nur ausnahmsweise treten eingreifendere Zerfallsprozesse ein, so daß größere Teile der Geschwulst in eine breiige, fettige Masse umgebildet sein können.

Die nahe gelegenen Glandeln sind ziemlich oft angeschwollen; nur in einem einzigen Falle zeigten sie makroskopische Veränderungen, die auf eine Metastasenbildung hindeuten könnten; leider gingen diese Glandeln aber verloren, ohne vorher mikroskopisch untersucht worden zu sein. Metastasierung nach inneren Organen wurde nie beobachtet.

Was den mikroskopischen Bau betrifft, so ist dieser je nach der Altersstufe der Geschwulst ein wenig verschieden. In nicht gar zu großen Geschwülsten findet man einen typisch carcinomatösen Bau (Taf. II. Fig. 3). In einem relativ spärlichen Bindegewebsstroma, das einige gewöhnliche Bindegewebszellen enthält, in der Regel aber keine Rundzelleninfiltrationen birgt, findet man eine große Anzahl Krebsalveolen, oft von ziemlich unregelmäßiger Form, die mit Krebszellen angefüllt sind. Die Versorgung mit Gefäßen scheint nicht besonders reichlich zu sein, in den Bildern tritt dieselbe gewöhnlich nicht hervor. Die Form der Zellen erweist sich bei näherer Untersuchung als etwas verschieden, sie sind rundlich, polygonal oder auch ganz unregelmäßig. Der Zellkörper ist groß, gewöhnlich ziemlich homogen, der Zellkern ist ebenfalls groß, rund oder oval mit hervortretendem Chromatingerüste und Kernkörperchen. In der Regel findet man Mitosen in ziemlich bedeutendem Umfange, und diese zeigen meistens völlig normale Verhältnisse, zuweilen sieht man jedoch auch atypische Mitosen von verschiedener Form.

(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Zur Kenntnis einiger Trematoden.

Mit 4 Figuren.

Von Dr. Ludwig Cohn-Greifswald.

Hoploderma mesocoelium n. g. n. sp.

Im Dünndarm eines *Draco volans* aus dem östlichen Java (älteres Spiritusexemplar) fand ich drei kleine Trematoden, für welche ich die oben genannte neue Gattung aufstellen muß. Im Schnitte erwiesen sich die anatomischen Details als genügend erhalten, wie ich denn jetzt schon mehrfach die Beobachtung machen konnte, daß altes, unter ungünstigen Bedingungen konserviertes Fasciolidenmaterial (Alkoholkonservierung des ganzen Wirtstieres) oft unerwartet gut erhalten ist, so daß sich die Untersuchung alter Doubletten (Schlangen, Eidechsen u. s. w.) wohl lohnt. Am Totalpräparate war nicht mehr zu sehen, als ich in Fig. 1 eingezeichnet habe, weil die Genitaldrüsen fast ganz durch die Uterusschlingen und den Bauchsaugnafp verdeckt werden; auch die Lage des Genitalporus ließ sich nicht feststellen und ist nach der Schnittserie eingezeichnet.

Die Fascioliden haben eine Totallänge von 1,8—1,9 mm und etwa in der Mitte der Länge die größte Breite von 0,61 mm. Nach dem Hinterende zu, das breit abgerundet ist, verschmälern sie sich kaum, während die Breite nach dem nur 0,3 mm breiten Vorderende hin langsam abnimmt. Der vordere, kleinere Teil vor dem Bauchsaugnafp ist hell und sehr durchsichtig, der hintere durch die immensen Eimassen dunkelbraun gefärbt.

Der Mundsaugnafp, in der Aufsicht eiförmig und 0,2 mm lang, hat dorsoventral eine Tiefe von nur 0,12 mm; am vordersten Ende gelegen, öffnet er sich rein ventral. An ihn setzt sich ein kleiner, 0,07 mm messender Pharynx an, dann folgt ein langer Oesophagus von 0,19 mm, der sich durch sehr starke Muskulatur, insbesondere Ringfasern, auszeichnet, so daß er wohl die geringe saugende Kraft des Pharynx zu unterstützen geeignet ist. Dicht hinter der Stelle, wo er in Fig. 2 eben noch getroffen ist, liegt die Gabelung der Darmschenkel. Diese verlaufen der dorsalen Seite genähert und treten nur mit ihrer stark konvexen

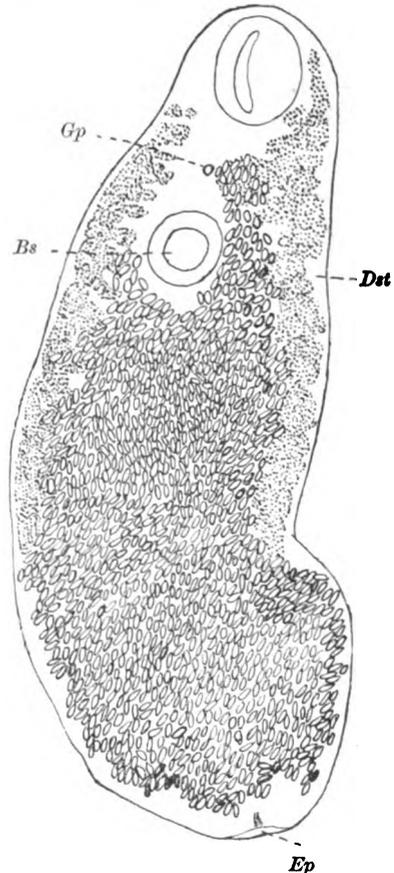


Fig. 1. *Hoploderma mesocoelium* n. sp.
Totalpräparat. 60/1.

Krümmung näher an den Seitenrand heran. Sie ziehen wenig über die Mitte der Körperlänge hinaus; sie reichen ganz wenig weiter als die Dotterstöcke (Fig. 1) nach hinten. In Fig. 2 ist, ebenso wie das hinterste Ende des Dotterstockes, so auch dasjenige des gleichseitigen Darm-schenkels getroffen.

Die Haut ist bei meinen Exemplaren nur streckenweise erhalten; wo sie aber am Vorderende erhalten ist, zeigt sie sich mit zahlreichen kleinen, dichtstehenden Stacheln durchsetzt. Das hintere Ende scheint unbewehrt zu sein. Das Wassergefäßsystem weist am Hinterende eine langgestreckte, schief dorsoventral verlaufende Exkretionsblase auf, die, kurz vor der Ausmündung am hintersten Ende, zu einer muskulösen Vesicula anschwillt; der dickwandige Kanal, durch welchen diese ausmündet, ist von großen Zellen (Drüsen?) umlagert.

Der Bauchsaugnapf liegt wenig hinter dem ersten Körperviertel, ist kuglig und hat einen Durchmesser von 0,13 mm, also kleiner als der Mundsaugnapf. Dorsal von ihm liegt der hintere Hoden; der vordere,

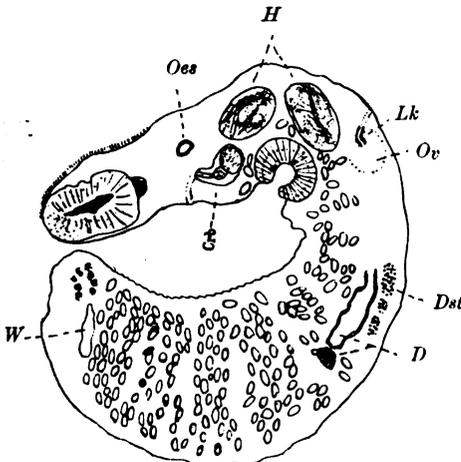


Fig. 2.

der direkt vor dem anderen liegt, befindet sich zum Teil auch noch im Bereich des Bauchsaugnapfes. Die Vasa efferentia münden in einen birnförmigen Cirrusbeutel, der fast Hodengröße hat und direkt vor dem Saugnapf, ventral vom vorderen Hoden liegt. Zu hinterst findet sich im Cirrusbeutel eine einmal im Knie geknickte Vesicula, mehr als die Hälfte des Hohlraumes ausfüllend. Der Cirrus ist dünn und lang. Der Genitalporus (seine Lage ist in Fig. 2 nach Nachbarschnitten durch Punktierung angegeben) liegt fast genau in der Mitte zwischen beiden Saugnapfen.

Hinter dem hinteren Hoden, und zwar ebenso weit von ihm entfernt, als er es von dem vorderen Hoden ist, liegt das nach vorn zugespitzte, birnförmige Ovarium von 0,2 mm. Es liegt ebenfalls dorsal, doch nicht in einer Linie mit den Hoden, sondern nach der anderen Seite etwas verschoben, so daß ich in Fig. 2 seine Lage nur andeuten konnte. Der Ovidukt entspringt dorsal am Hinterende und wendet sich alsbald rückwärts, um den Ausführungsgang des Receptaculum aufzunehmen, das, 0,12 mm groß, dicht hinter dem Ovar liegt. Der Laurersche Kanal beginnt (Fig. 2) bereits auf der Höhe des hinteren Hodens und zieht außen am Ovarium vorüber. Die Schalendrüse liegt nach innen vom Receptaculum. Der Uterus steigt in anfangs ganz, später überwiegend quer verlaufenden Windungen nach hinten und füllt die ganze hintere Körperhälfte bis zur Exkretionsblase dicht aus. Der aufsteigende Ast windet sich dann ventral zwischen Hoden und Cirrusbeutel einerseits, dem Bauchsaugnapfe andererseits durch und mündet hinter dem Cirrus. Die Eier sind überaus zahlreich und recht klein, 0,06 : 0,048 mm.

Die Dotterstöcke bestehen aus dicht gedrängten zahlreichen Follikeln

und ziehen an beiden Rändern bis kurz vor das Ende der Darmschenkel; sie liegen nach außen zu von diesen und umfassen sie. Vorn reicht der eine Dotterstock bis dicht an das Hinterende des Mundsaugnapfes, während der andere an diesem seitlich vorüber bis fast an das äußerste Vorderende zieht. Der Verbindungsgang beider Dotterstöcke liegt wenig hinter der Schalendrüse.

Ogleich mit *Dicrocoelium* Duj. part. (Looss 1899, p. 633) verwandt, ist die vorstehend beschriebene Art Repräsentant eines neuen Genus, das hauptsächlich durch die noch stärkere Verlagerung der Keimdrüse und der Hoden nach vorn gekennzeichnet ist. Die Diagnose der Gattung wäre: Bestachelte Fascioliden mit einander genäherten Saugnapfen, von denen der Mundsaugnapf größer ist. Die Hoden dorsal vom Bauchsaugnapf, auf gleicher Höhe mit diesem, hinter einander; Ovarium dicht hinter den Hoden. Laurerscher Kanal vorhanden, ebenso Begattungsorgan. Darmschenkel wenig über die Mitte der Körperlänge reichend, Oesophagus lang. Dotterstöcke stark entwickelt und bis zum Mundsaugnapf reichend. Uterus in der hinteren Körperhälfte.

Amphistomum dolichocotyle n. sp.

In demselben Exemplare von *Herpetodryas fuscus*, in welchem ich das von mir beschriebene *Leptophyllum stenocotyle* fand, war im Enddarm noch ein zweiter Trematode enthalten. 0,9—1,0 mm lang, waren die Exemplare birnförmig, am Hinterende, der breitesten Stelle, 0,42 mm breit, während die Breite vorn, gleich hinter dem Mundsaugnapf gemessen, nur 0,22 mm betrug. Der dorsoventrale Durchmesser war dem queren etwa gleich, so daß Querschnitte durch alle Teile der Länge etwa kreisförmig wurden.

Das Vorderende wird von dem großen Mundsaugnapf eingenommen, an dessen zentrale Höhlung sich zwei große, seitliche Taschen ansetzen, die am Kreosotpräparate in toto gut zu sehen sind. Der gesamte Saugapparat mißt 0,16 : 0,13 mm. Die Scheidewand zwischen beiden aneinander grenzenden Taschen sondert dieselben bis oben, so daß sie nur mit dem eigentlichen Saugnapfflumen, das sich in den Oesophagus fortsetzt, kommunizieren. Die Wandung der Taschen ist dick, aber von sehr loser Textur und von nur spärlichen Radiärfasern durchsetzt, zwischen welchen zahlreiche große Muskelzellen liegen. Einige Exemplare zeigen, daß der Mundsaugnapf mit Hilfe der Taschenmuskulatur etwas vorgestülpt werden kann, so daß er dann lippenförmig über das Vorderende hinausragt. Der Hohlraum der Taschen ist, je nach dem Kontraktionszustande, bald rund, bald verengt bis spaltförmig, am Hinterende stets enger als vorn. Ein Faktum, das ich mir nicht zu deuten weiß, das ich aber auf Schnitten mehrfach konstatieren konnte, ist, daß die Saugnapftaschen nach hinten zu eine Durchbohrung ihrer Wandung aufweisen. Ich konnte aber nirgends den Zusammenhang des hier durchtretenden Kanals mit irgend etwas anderem auffinden, — das Lumen der Taschen öffnet sich hinten durch den Gang einfach jederseits ins Parenchym; der Erhaltungszustand war zur sicheren Verfolgung der einschlägigen histologischen Verhältnisse doch nicht gut genug. Ausgeschlossen ist die Verbindung dieser Gänge mit den (weiter unten beschriebenen) Auftreibungen der Exkretionsgefäße, die hier in der Nähe dicht am Mundsaugnapf liegen.

Auf den Mundsaugnapf folgt ein ansehnlicher Oesophagus von 0,12 mm Länge und geringer Breite, dessen Hinterende, dicht der

Darmgabelung aufsitzend, der kleine kuglige Pharynx von 0,06 mm Durchmesser umgibt. Die Darmschenkel haben die mehrfache Breite des Oesophagus, sind aber nur kurz; sie durchziehen noch nicht das ganze mittlere Drittel der Körperlänge und enden schon vor den Dotterstöcken, in einer Höhe etwa mit dem Hinterrande des Hodens (Fig. 3). Das Darmlumen ist mit einem recht hohen Epithel ausgekleidet.

Der Exkretionsporus liegt nahe dem Hinterrande auf der dorsalen Fläche (etwa auf der Höhe der Mitte des Endsaugnapfes). Die kurze, weite Exkretionsblase geht erst gerade nach vorn, teilt sich aber bald in zwei Längskanäle, die in starken Windungen nach dem Vorderende hinziehen. Sie verlaufen innerhalb der Darmschenkel, dorsal und beiderseits der Mittellinie genähert, im vordersten Teil nahe am Oesophagus und parallel demselben. Nahe am Hinterrande des Mundsaugnapfes biegen dann die Gänge beiderseits nach außen, den hinteren Rand der

Taschen umziehend, und enden nach außen von den letzteren mit einer langgestreckten Verbreiterung, welche durch Muskelfasern am Hautmuskelschlauch aufgehängt sind. Die Exkretionskanäle sind in ihrem Verlaufe von sehr wechselnder Breite, selbst auf Querschnitten aber nicht zu verkennen, da ihr charakteristischer Inhalt aus tiefdunkeln, kleinen Kugeln besteht, welche auch am Totalpräparate in Kreosot die Exkretionskanäle als dunkle Streifen und ebenso die Auftreibungen im Vorderkörper erkennen lassen.

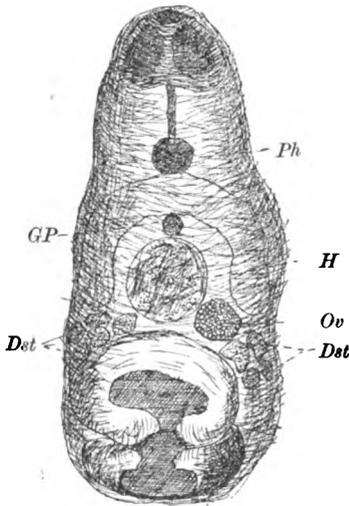


Fig. 3. *Amphistomum dolichocotyle* n. sp. Totalpräparat. 65/1.

Mehr als doppelt so groß, wie der Mundsaugnapf samt Taschen, ist der kräftige Endsaugnapf. Wie ich in Fig. 3 anzudeuten suchte, liegt dieser Saugnapf zum Teil noch auf der ventralen Fläche, greift aber schon bedeutend nach der terminalen Fläche über. Er ist 0,3 mm breit bei 0,37 mm Länge. Er hat zwei, hintereinander liegende Sauggruben, von denen die vordere noch ganz ventralwärts,

die hintere schon mehr terminalwärts gewendet ist. Die äußere Umrandung des Gesamtnapfes verläuft, eine Einkerbung zwischen beiden Gruben ausgenommen, kontinuierlich um beide, die innen durch eine niedrige, die Höhe der Umwallung nicht erreichende Scheidewand von einander getrennt sind.

Ein charakteristisches Merkmal des Genitalsystems ist das Vorhandensein nur eines Hodens. In der Mittellinie, von der Darmgabelung nur durch den Genitalporus getrennt und der ventralen Fläche genähert, liegt der kuglige Hoden von 0,17 mm Durchmesser. Das Vas deferens geht am hinteren Ende des Hodens dorsal ab, verläuft erst, stark gewunden, ventralwärts, um dann nach vorn zu umbiegen. Der Cirrhusbeutel ist kolbenförmig und seine Richtung ist fast ganz dorsoventral. Sein dorsales, erweitertes Ende enthält eine mäßig große Vesicula seminalis. Die Ausmündung des Cirrhus liegt in einem flachen Genitaltrium neben dem weiblichen Porus.

Hinter dem Hoden liegen die weiblichen Genitaldrüsen, die nicht

weiter als bis zur Mitte des Endsaugnapfes nach hinten reichen. Das etwa kuglige Ovarium ist klein, nur 0,075 mm im Durchmesser, und enthält wenig zahlreiche Eizellen. Es liegt rechts von der Mittellinie, zum Teil noch auf einer Höhe mit dem Hinterende des Hodens. Seitlich den Rändern des Endsaugnapfes sind die Dotterstöcke angelagert, deren jederseits wenige Follikel durch eine breite Brücke in Verbindung treten, so daß man fast den Eindruck eines zweiflügeligen Organes erhält. Ganz dorsal und auf der linken Seite liegt das langgestreckte, gewundene Receptaculum seminis auf einer Höhe mit dem Ovarium; der Laurersche Kanal ist kurz und mündet median etwa in einer Höhe mit dem Hinterende des Hodens. Die kompakte runde Schalendrüse liegt medianwärts neben dem Ovarium (zwischen diesem und dem Receptaculum) und hat etwa die Größe des Ovariums. Der Uterus wendet sich, von der Schalendrüse aus, dorsalwärts, zieht zuerst mit einer kurzen Schlinge nach dem hinteren Körperende zu, wendet sich dann nach vorn und verläuft dorsal und in starken Querwindungen zum Genitalporus. Die Eier sind wenig zahlreich und sehr groß; sie messen 0,073 : 0,036 mm.

Die Verwandtschaft der eben beschriebenen Art mit *Diplodiscus subclavatus* (G.) ist aus einigen Punkten der Organisation unverkennbar. Die Konfiguration des Mundsaugnapfes, die Einzahl des Hodens, die Lagerung des Ovariums sind entsprechend, ebenso die Bildung des Darmtraktes. An diesen Froschparasiten erinnert auch durchaus der Verlauf und das optische Verhalten des Exkretionsapparates sowie der Verlauf des Uterus mit den wenigen, großen Eiern. Ganz abweichend verhalten sich aber, abgesehen vom Endsaugnapfe, die Dotterstöcke, die bei meiner Species karg, bei *Dipl. subclavatus* sehr stark entwickelt sind. Jedenfalls ist dem *Amph. brachycoelium* eine Stellung in der Nähe jener Art anzuweisen, wenn es auch wohl ein anderes Genus vertritt. Ich stelle dieses nicht auf, da sich die Begründung neuer Genera auf einzeln stehende Arten für diese Gruppe noch nicht empfiehlt, solange eine allgemeine Uebersicht und somit ein Einblick fehlt, welches die wichtigen, zur generischen Einteilung geeigneten Merkmale sind.

Ueber Kopulation durch den Laurerschen Kanal.

In No. 12. Bd. XXXII. 1902 dieser Zeitschrift beschrieb ich einen Fund unter den Original Exemplaren von *Liolope copulans* C., den ich als Kopulation zweier Exemplare durch den Laurerschen Kanal deutete; ich gab auch eine Abbildung der beiden zusammenhängenden Individuen nach einem Totalpräparate. Daß es sich um eine Kopulation handelte, schloß ich aus der gegenseitigen Lagerung der Fascioliden; die eine hatte ihre Bauchfläche der Rückenfläche der anderen zugekehrt und war mit ihr in der Höhe etwa, wo der Laurersche Kanal der zweiten liegen mußte, durch eine Brücke, die ich als Cirrus deutete, verbunden. Seitdem ist mir der Zweifel ausgesprochen worden, die Abbildung ergebe denn doch nicht mit genügender Sicherheit den Beweis für eine Kopulation der Art. Ich entschloß mich daher, eine Schnittserie (sagittal) durch beide Exemplare zu legen. Bei der Kleinheit des Objektes und der verschiedenen Krümmung der Exemplare war die Orientierung schwer, so daß die Schnitte nur subsagittal gingen, doch läßt sich immerhin aus der Serie mit Sicherheit nachweisen, daß meine erste Deutung den Tatsachen entsprach. Zum Beweise reproduziere ich aus der Serie vier Schnitte (Fig. 4 a—e). Das in den Abbildungen oben

liegende Individuum wendet seine konkav eingebogene Bauchseite nach oben; das untere kehrt der Rückenseite des ersteren seine Bauchseite zu (Fig. 3 l. c. ist also um 90° nach links gedreht). In Fig. 4a ist der

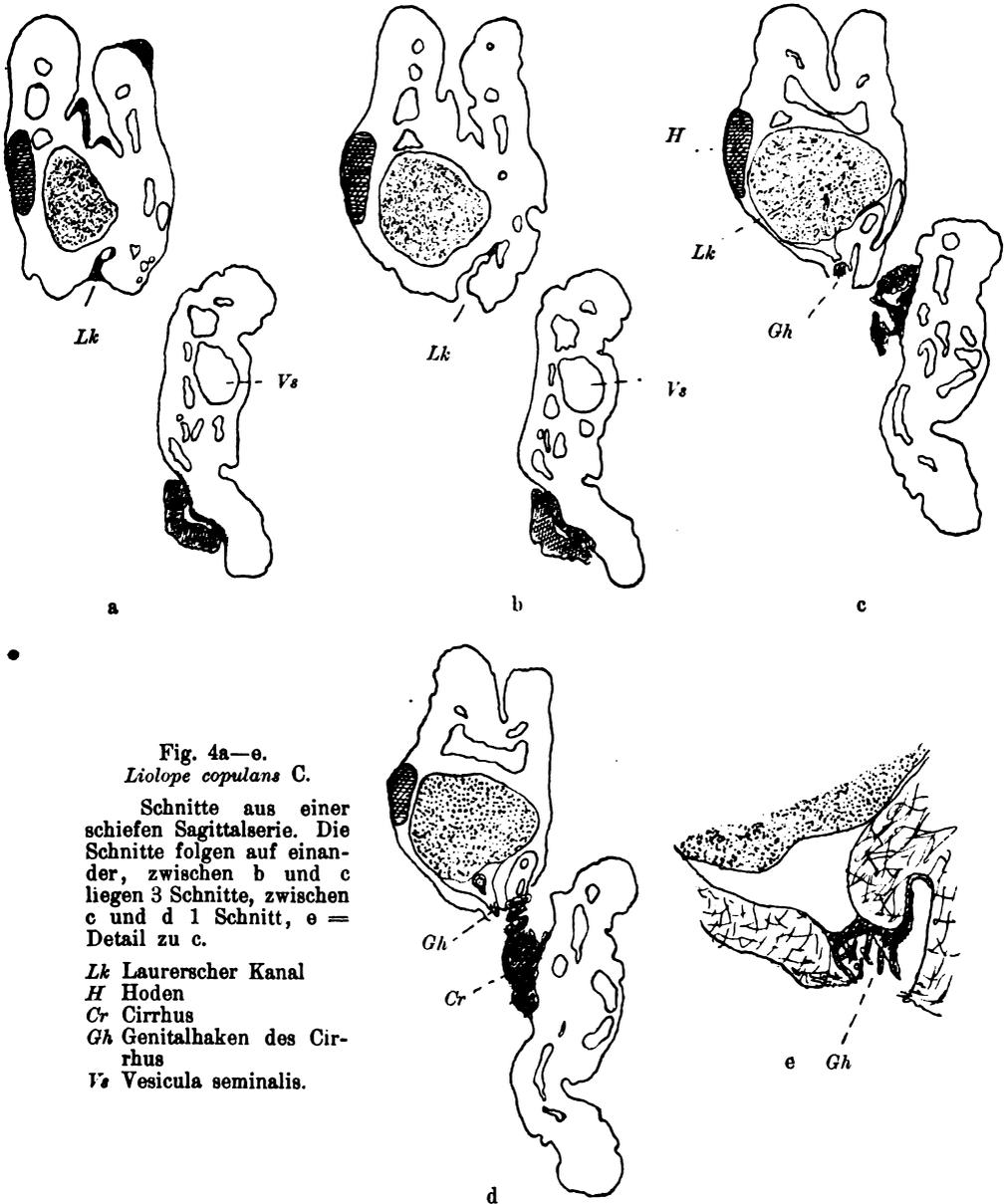


Fig. 4a—e.
Liolope copulans C.

Schnitte aus einer schiefen Sagittalserie. Die Schnitte folgen auf einander, zwischen b und c liegen 3 Schnitte, zwischen c und d 1 Schnitt, e = Detail zu c.

Lk Laurerscher Kanal
H Hoden
Cr Cirrus
Gh Genitalhaken des Cirrus
Vs Vesicula seminalis.

Laurersche Kanal eben angeschnitten, in 4b, dem nächstfolgenden Schnitte der Serie (zu 10μ) steht er offen. Vergleiche mit normalen Exemplaren zeigen, daß die Kanalmündung gegenüber dem Ruhezustande stark gedehnt ist, was, wie weiter unten folgt, auch für die anderen Teile

des Laurerschen Kanals der Fall ist. Zwischen 4b und c liegen drei Schnitte. In 4c sehen wir am unteren, aktiven Exemplar den Cirrus oberflächlich an der Wurzel angeschnitten, in 4d ist er schon besser getroffen, so daß sein Tangentialschnitt schon bis an das obere Individuum heranreicht; er war es, der die beiden Exemplare zusammenhielt. In meiner ersten Notiz (l. c. p. 879) schrieb ich: „Die Basis liegt zwar frei, doch ist bei der großen Länge des Cirrus das versenkte Ende lang genug, um tief im Laurerschen Kanal zu haften“. Und so finden wir auch in 4c am Kanäleingang Haken des Cirrus (Gh.) haften (Fig. 4e gibt das Detail bei stärkerer Vergrößerung), und sehen dann in 4d im Innern des ganz schief angeschnittenen Kanals gleiche Cirrus-haken.

Aus der Beschreibung und Fig. 2e der vorigen Notiz geht hervor, das *Liolope copulans* kein Receptaculum seminis besitzt; hier hingegen sehen wir im Zusammenhang mit dem Laurerschen Kanal (ein anderer Schnitt zeigt die Verbindungsstelle) eine große, prall mit Sperma gefüllte Höhlung. Es ist das ein temporäres Receptaculum, — eine passive Auftreibung des inneren Endabschnittes des Kanals, der ja, wie meist die Genitalgänge der Plathelminthen, stark dehnbar ist. So ist bei *Liolope copulans* bei jungen Exemplaren auch die Vesicula nur klein, später aber, auf der Höhe der Entwicklung, von kolossaler Größe.

Auf Grund des Vorstehenden kann jetzt, glaube ich, kein Zweifel bestehen, daß hier eine Kopulation durch den Laurerschen Kanal vorlag. Mit Rücksicht auf das Nächstfolgende möchte ich noch bemerken, daß auch bei dem passiven Exemplare, wie benachbarte Schnitte zeigen, der Cirrus voll ausgestülpt ist.

Ich habe nämlich noch einen zweiten Fall zu erwähnen, der mir sonst wohl nicht deutlich genug gewesen wäre, um ihn zu beschreiben, im Anschluß an das Vorhergehende aber wohl als weiterer Beleg dienen kann. Unter zahlreichen Exemplaren von *Echinostomum spinulosum* (Rud.) aus *Alca torda* fand ich zwei, die fest aneinander hafteten. Das eine kehrte, ganz wie in dem oben beschriebenen Fall, seine Bauchseite nach außen, das andere hatte seine Bauchseite auf den Rücken des ersteren gelegt, das Vorderende herumgebogen und sich mit dem Mundsaugnapf festigt; beide lagen aber nicht, wie bei *L. copulans*, von einander fortgebogen, sondern einander dicht an. Eine Querschnittserie durch beide gemeinsam zeigte nun, daß das festgesogene den Cirrus hervorstülpt hat, der hier zwar nicht im Laurerschen Kanal des anderen steckt, aber dicht daneben liegt: 40 μ vor dem Schnitte, der bei dem passiven Exemplare den Laurerschen Kanal offen zeigt, erscheint genau an derselben Stelle bei dem aktiven der ausgestülpte Cirrus. Da Laurerscher Kanal und Cirrus nur $\frac{1}{2}$, mm voneinander entfernt sind, so darf man wohl das bei dem passiven Exemplare prall mit Sperma gefüllte Receptaculum dahin deuten, daß hier soeben die Kopulation stattgefunden hat. Und auch das passive Exemplar hat den Cirrus vorgestülpt — ganz wie bei *L. copulans*, was wohl mit der Erregung bei der Kopulation durch den Laurerschen Kanal im Zusammenhange steht.

Aus dem oben Beschriebenen folgt:

1) Eine Begattung durch den Laurerschen Kanal findet bei Fascioliden statt, und zwar als dritter Modus neben der Befruchtung zwischen zwei Individuen durch das Uterusende einerseits, der Selbstbefruchtung auf gleichem Wege andererseits (für diesen letzten Modus

liegt mir in *Brach. crassicolle* ein Beleg vor, indem man auf Sagittalschnitten den in den eigenen Uterus eingeführten Cirrhus sieht).

2) Das Vorhandensein oder Fehlen des Receptaculum seminis im Verlaufe des Laurerschen Kanals sowie die Größe des Receptaculum sind keine zuverlässigen systematischen Merkmale, da ein solches bei *L. copulans*, wo ein Receptaculum sonst fehlt, zeitweilig auftreten kann.

Nachdruck verboten.

Ein neuer Fall von *Dipylidium caninum* (L.) beim Menschen.

Von F. Zschokke, Basel.

Der Bandwurm *Dipylidium caninum* (L.), der vielleicht besser unter den Namen *Taenia canina* L., *T. cucumerina* Bl., *T. elliptica* Batsch bekannt ist, gehört zu den allerhäufigsten Darmschmarotzern von Hund und Katze. Besonders regelmäßig und oft massenhaft bewohnt er die in Haus und Zimmer gehaltenen Tiere. Viel seltener verirrt sich die Tänie auf den Menschen; immerhin ist ihr Vorkommen im menschlichen Darm in etwa 34 Fällen festgestellt worden.

Die Fälle verteilen sich geographisch in folgender Weise: Rußland 3 Fälle, Schweden 4 Fälle, abgesehen von den Angaben Linnés und seines Schülers God. Dubois, die den Bandwurm als den Menschen häufig bewohnend bezeichnen, Dänemark 7 Fälle, Schottland 1 Fall, Frankreich 2 Fälle, Deutschland ca. 11 Fälle, Schweiz 6 Fälle.

Es darf indessen als sicher gelten, daß sich der Parasit im Menschen viel häufiger einstellt und unbeachtet bleibt, da er entweder nennenswerte Krankheitserscheinungen nicht hervorruft oder die Aerzte seine Gegenwart nicht zu entdecken wissen.

In der kasuistischen Zusammenstellung über das Vorkommen von *D. caninum* im Menschen nimmt die Schweiz eine ziemlich ungünstige Stellung ein.

Schoch-Bolley fand den Bandwurm in einem Kind; H. Müller zitiert sein Auftreten in drei erwachsenen Personen von 38, 40 und 45 Jahren und in einem 13 Monate alten Kind¹⁾. Zu diesen 5 in Zürich und Umgebung beobachteten Fällen kann ich einen Fall aus Basel fügen. Ein Studierender der Medizin sammelte im Dickdarm einer männlichen Leiche (Alter 35—40 Jahre) bei Gelegenheit der Sezierübungen eine Anzahl freier Glieder des Hundebandwurms. Die Proglottiden erreichten eine Länge von 10 und eine Breite von 1,5 mm; sie waren mit Eipaketen gefüllt.

Bemerkenswert sind die schweizer Fälle der Gegenwart von *D. caninum* im Menschen auch dadurch, daß sie sich zum größeren Teil auf erwachsene Personen beziehen. Nur zweimal wurde der Wurm in Kindern, in vier Fällen dagegen in Männern und Frauen von 35—40 Jahren gefunden.

Dieses Verhältnis steht im Widerspruch zu den an anderen Orten gemachten Erfahrungen. Im erwachsenen Menschen wurde *D. caninum* außerhalb der Schweiz nur zweimal, von Blanchard in Frankreich und von Cobbold in Schottland, nachgewiesen. Dem stehen 24 sichere Mitteilungen über das Vorkommen des Schmarotzers in Kindern von

1) Er traf den Wurm dreimal in demselben Jahre im Menschen an.

7 Wochen bis 14 Jahren gegenüber. Von den 24 Fällen beziehen sich 21 auf die Infektion im zartesten Alter von höchstens 3 Jahren, die übrigen 3 verteilen sich auf Kinder von 8, 13 und 14 Jahren. In mindestens 9 Fällen bewohnte *D. caninum* Kinder, welche das erste halbe Lebensjahr noch nicht zurückgelegt hatten. Die Tānie könnte also beinahe der Bandwurm der kleinen Kinder genannt werden, wenn nicht die in der Schweiz gemachten Erfahrungen auch für ihr häufigeres Vorkommen bei Erwachsenen sprechen würden.

Ueber die Lebensgeschichte von *Dipylidium caninum* sind wir genügend aufgeklärt. Melnikoff zeigte vor geraumer Zeit, daß die Hundelaus, *Trichodectes canis*, dem Bandwurm als Zwischenwirt dient; Grassi und Rovelli bewiesen später, daß der Hundfloh, *Pulex serraticeps*, noch viel häufiger die Rolle des Zwischenträgers übernimmt und daß auch im Menschenfloh, *P. irritans*, das cysticerkoide Stadium der Tānie zur Entwicklung gelangt. Dagegen scheint die früher von verschiedenen Autoren vertretene Ansicht direkter Uebertragung des Parasiten, ohne Benützung eines Zwischenwirts, sich nach neueren Erfahrungen nicht halten zu lassen. Eingeschlossen in die Epizoen des Hundes würden also die Larvenstadien von *D. caninum* in den Darm des definitiven Wirts — Hund, Katze, Mensch — Einkehr halten¹⁾.

Bei Hunden bringt die Gegenwart zahlreicher Exemplare des Cestoden nicht selten schwere digestive und nervöse Störungen hervor. So erscheint es durchaus nicht ausgeschlossen, daß der Scharotzer auch für den Menschen gelegentlich pathogene Bedeutung gewinnen kann.

Eine Kontrolle des Vorkommens der Tānie bei Hund und Katze dürfte wohl geboten sein. Nach meinen Erfahrungen bewohnt der Parasit die Hunde von Basel und Umgebung äußerst häufig, die Katzen etwas seltener. Die lästig große Zahl überflüssiger Hunde, die hier gehalten werden, leistet der Verbreitung des Bandwurms allen nur wünschbaren Vorschub.

Daß eine schärfere Ueberwachung der Hunde angezeigt wäre, beweist das in letzter Zeit wiederholt beobachtete Auftreten von *Echinococcus*-Infektion des Menschen in Basel. Ein Fall des Vorkommens des Parasiten war besonders typisch und furchtbar. Es handelt sich um einen im Bürgerspital verstorbenen 35-jährigen Mann, der Basel selten, die Schweiz nie verlassen hatte. Im Netz beherbergte er, wie die Sektion zeigte, 30—35 Echinokokkencysten von Erbsen- bis Faustgröße; der Beckenraum war von den Blasen erfüllt. Außerdem lag in der Leber ein *Echinococcus cysticus*. Den verhängnisvollen Parasiten verdanken wir bekanntlich ebenfalls dem treuen Freund, Hund genannt.

Die Literatur über *Dipylidium caninum* hat Huber in seiner „Bibliographie der klin. Helminthologie“ sehr gut zusammengestellt; derselbe Autor gibt im Anschluß an eine Notiz von Asam, der den Bandwurm bei einem Kind in Murnau beobachtete, ein kasuistisches Verzeichnis, dem ich nur wenig beifügte. Gleichzeitig ergänzte er die bibliographischen Angaben. (Münchner mediz. Wochenschr. 1903. No. 8.)

1) Ricerche embriologiche sui Cestodi. (Atti dell' accademia Gioenia di scienze naturali in Catania. Vol. IV. 1892.)

Anmerkung. Durch Herrn Dr. W. Bulloch erhielt der Unterzeichnete vor wenigen Tagen ein Gläschen mit reifen Gliedern von *Dipylidium caninum*, die einem im „London Hospital Medical College“ poliklinisch behandelten Kinde zu mehreren Hundert abgegangen waren.

Königsberg i. Pr., 10. Mai 1903.

M. Braun.

Nachdruck verboten.

Weitere Beiträge zur Agglutination der Staphylokokken.

[Aus dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Koch.)]

Von Dr. **R. Otto**, Oberarzt beim 1. Garde-Feldartillerie-Regiment,
Assistenten am Institute.

Als im vergangenen Jahre Prof. W. Kolle und ich ¹⁾ den Nachweis führten, daß hochwertig agglutinierendes, mit menschenpathogenen Traubenkokken hergestelltes Serum als ein Differenzierungsmittel der echten menschenpathogenen Staphylokokken und der saprophytischen Kokkenarten benutzt werden kann, war es uns — bei dem verhältnismäßig seltenen Vorkommen des *Staphyl. citreus* in Eiterherden des Menschen — nicht geglückt, in den Besitz eines aus Eiter stammenden *Staph. pyogenes citreus* zu gelangen, der von unserem Serum agglutiniert wurde und somit sich als echter menschenpathogener *Staphylococcus* erwiesen hätte. Erst anfangs dieses Jahres erhielten wir durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Czaplewski (Cöln) einen *Staph. citreus*, den er fast in Reinkultur neben einzelnen Streptokokken in Furunkeliter gefunden und aus demselben isoliert hatte. Auf Anregung des Herrn Prof. Kolle benutzte ich daher diese Gelegenheit, um die Zugehörigkeit dieses *Citreus* zur Klasse der menschenpathogenen Traubenkokken nachzuweisen, zumal auch aus der Arbeit von Neisser und Wechsberg ²⁾ über das Staphylotoxin hervorgeht, daß ihnen bei ihren Untersuchungen kein *Staph. citreus* zur Verfügung gestanden hat.

Die morphologische und kulturelle Prüfung ergab, daß sich der übersandte *Citreus*, außer durch seine schöne, saftige, citronengelbe Farbbildung, beim Wachstum auf schwach alkalischem Agar, in Gelatine etc. in nichts von *Aureus*- und *Albus*-Stämmen unterschied. Er war unbeweglich, färbte sich mit den gebräuchlichen Farblösungen gut und behielt, nach Gram gefärbt, die Violettfärbung. Die Gelatine wurde von ihm ziemlich stark verflüssigt, Bouillon gleichmäßig getrübt und in Traubenzuckerbouillon kein Gas gebildet. Für Mäuse und Meerschweinchen zeigte er sich wenig pathogen, dagegen tötete $\frac{1}{10}$ Oese, intravenös Kaninchen eingespritzt, dieselben prompt in 36—48 Stunden. Im Vergleich zu dem *Staph. aureus* I und *albus* XII unserer Sammlung erwies sich der neue *Citreus* in Bezug auf Hämolyseinbildung als in der Mitte stehend. Die Menge des von diesen 3 Traubenkokken beim Wachstum in schwach alkalischer Bouillon (13 Tage lang bei 37°) gebildeten Staphylohämolytins verhielt sich für den *Aureus*-, *Citreus*- und *Albus*-Stamm wie 1:2:5. Die Prüfung der Quantität der gebildeten Lysine ergab nämlich, daß die einfache, komplett Blutkörperchen lösende Dosis bei dem

<i>Staph. aureus</i> I	0,1 ccm
„ <i>citreus</i> XXXV	0,2 „
„ <i>albus</i> XII	0,5 „

1) Kolle, W. und Otto, R., Die Differenzierung der Staphylokokken mittels der Agglutination. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLI. 1902.)

2) Neisser, M. und Wechsberg, F., Ueber das Staphylotoxin. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVI.)

betrug. Aehnlich verhielten sich die 3 Staphylokokken in Bezug auf die Leukocidinbildung, indem auch hier der Citreus in der Mitte stand. Durch Benutzung eines Aureus- und eines Citreus-Antihämolytins ließ sich leicht durch die bei Einstellung des Aureus-Toxins mit dem Citreus-Antitoxin (und umgekehrt) erfolgende Neutralisierung der Nachweis für die Identität der von dem Citreus und dem Aureus gebildeten Toxine liefern, wie dies bereits von Neisser und Wechsberg für die Albus- und Aureus-Toxine geschehen ist. Wenn nun hierdurch schon mit großer Wahrscheinlichkeit die Arteinheit der 3 pyogenen Staphylokokken erwiesen war, so war doch der sichere Beweis dafür noch nicht erbracht, daß es sich im vorliegenden Falle um einen echten menschenpathogenen Staphylococcus handelte. Zur Zeit ist dieser nur auf Grund der Agglutination möglich. Es fehlte bisher noch die Beweisführung, daß nur die echten menschenpathogenen, von spezifischem Serum agglutinierten Traubenkokken, Staphylokokken bilden.

Zur Anstellung der folgenden Versuche benutzte ich außer dem übersandten Citreus-Stamm (No. XXXV) einen nicht pathogenen Citreus unserer Sammlung (No. XXVI), sowie je 1 echten pyogenen Aureus und Albus (No. I und XII) und je 1 nicht pathogenen Aureus- und Albus-Stamm (VIII und IX). Während mir für die Kulturen I, XII, XXXV und VIII die homologen Serumproben zur Verfügung standen, ist es mir bisher nicht gelungen, mit dem Staphylococcus IX und XXVI ein hochwertig agglutinierendes Serum zu gewinnen. Hierauf muß besonders Wert gelegt werden, denn aus der Unmöglichkeit mit den genannten Kulturen IX und XXVI ein hochwertig agglutinierendes Serum herzustellen, geht mit Sicherheit hervor, daß diese Kokken nicht in die Gruppe der echten pathogenen Traubenkokken gehören. Es wird dadurch der Einwand entkräftet, daß dieselben schwer agglutinable bzw. inagglutinable Kokkenstämme wären. Die Untersuchungen über die Agglutinationseigenschaften der Staphylokokken, mit welchen Herr Prof. Kolle und ich uns noch dauernd beschäftigt haben, lassen keine Zweifel darüber, daß es Unterschiede in der Agglutinabilität der einzelnen Kokkenstämme gibt. Man findet unter den echten pathogenen Kokken schwer und leicht agglutinierbare Kulturen. Ich hatte erst neuerdings Gelegenheit, einen aus einem Osteomyelitisherde stammenden, auffallend schwer agglutinierbaren Aureus-Stamm zu erhalten. Dieser wurde von einem Serum, das alle unseren pathogenen Kulturen mindestens bei 1:1000 deutlich agglutiniert, nur bis 1:100 agglutiniert, während allerdings normales Serum derselben Tierart ihn auch bei Verdünnungen von 1:20 in keiner Weise beeinflusste. Es wurde nun mit dieser Kultur ein Serum an Kaninchen hergestellt und es zeigte sich, daß das Tier nach kurzer Vorbehandlung ein stark agglutinierendes Serum gab, welches unsere pyogenen Traubenkokkenkulturen bis 1:1000 deutlich agglutinierte und natürlich auch den — homologen — schwer agglutinierbaren Stamm, aber diesen wieder nur bis 1:200. Die folgende Tabelle zeigt ferner, daß von demselben Serum (No. XXXVI) die nicht menschenpathogenen Stämme selbst bei Konzentrationen von 1:50 nicht beeinflusst wurden.

Um nun auf den Staph. citreus zurückzukommen, so gebe ich hier zunächst noch einmal eine Tabelle mit Angaben über die Herkunft der bei den folgenden Agglutinationen verwandten Stämme. Alles nähere, insbesondere über die Ausführung der Agglutinationen ergibt sich aus der bereits oben erwähnten Arbeit „Ueber die Differenzierung

Tabelle I.
Einstellung eines Kaninchen-Staphylokokkenserums (XXXVI) mit Traubenkokken verschiedener Herkunft.

Lfd. No.	Kultur	Verdünnung					Kontrolle mit normalem Kan.-Serum Verdünnung	
		$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$
1	Aureus I	+	+	+	+	+	0	0
2	„ VIII	0	0	0	0	0	0	0
3	Albus IX	0	0	0	0	0	0	0
4	„ XII	+	+	+	+	+	0	0
5	Citreus XXVI	0	0	0	0	0	0	0
6	„ XXXV	+	+	+	+	+	0	0
7	Aureus XXXVI	+	+	Grenze +	0	0	0	0

der Staphylokokken mittels der Agglutination“. Bemerkt sei noch, daß das Serum von Kaninchen mittels intravenöser Injektionen gewonnen wurde. Die Tabellen III bis VI lassen die Ausführung der einzelnen Untersuchungen erkennen.

Tabelle II.
Herkunft und Hämolyisinbildung.

Lfd. No.	Kultur	Herkunft	Hämolyisinbildung
1	Aureus I	Peritonitis purul.	+
2	„ VIII	Luft	0
3	Albus IX	Haut	0
4	„ XII	Absceß	+
5	Citreus XXVI	Krälsche Sammlung	0
6	„ XXXV	Furunkel	+

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die 3 pyogenen (aus Eiter vom Menschen stammenden) Kulturen Hämolyisin bildeten, während bei den Stämmen No. VIII (Luft), IX (Haut) und XXVI (Kräl) keine Spur von Hämolyisinbildung nachzuweisen war. Weitere Untersuchungen bestätigten bei allen bisher von mir daraufhin geprüften Staphylokokkenkulturen, daß alle agglutiniert werdenden Stämme Hämolyisin bildeten, während dies bei den nicht agglutiniert werdenden nicht der Fall war.

Tabelle III.
Agglutination mit Aureus-Serum I. Titre: 0,0005.

Lfd. No.	Kultur	Staphylokokkenserum I (Kaninchen)						Normales Kan.-Serum Verdünnung		
		Verdünnung						$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	
		$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{5000}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$
1	Aureus I	+	+	+	+	+	+	0	0	0
2	„ VIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Albus IX	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	„ XII	+	+	+	+	+	0	0	0	0
5	Citreus XXVI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	„ XXXV	+	+	+	+	+	0	0	0	0

Tabelle IV.
Agglutination mit Aureus-Serum VIII. Titre: 0,002.

Lfd. No.	Kultur	Staphylokokkenserum (Kaninchen)					Normales Kaninchenserum		
		Verdünnung					Verdünnung		
		1/50	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/50	1/100	1/200
1	Aureus I	0	0	0	0	0	0	0	0
2	„ VIII	+	+	+	+	0	0	0	0
3	Albus IX	0	0	0	0	0	0	0	0
4	„ XII	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Citrus XXVI	0	0	0	0	0	0	0	0
6	„ XXXV	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle V.
Agglutination mit Albus-Serum XII. Titre: 0,0002.

Lfd. No.	Kultur	Staphylokokkenserum (Kaninchen)							Normales Kaninchenserum			
		Verdünnung							Verdünnung			
		1/50	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/2000	1/5000	1/10000	1/50	1/100	1/200
1	Aureus I	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
2	„ VIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Albus IX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	„ XII	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
5	Citrus XXVI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	„ XXXV	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0

Tabelle VI.
Agglutination mit Citrus-Serum XXXV. Titre: 0,005.

Lfd. No.	Kultur	Staphylokokkenserum XXXV (Kaninchen)							Normales Kaninchenserum			
		Verdünnung							Verdünnung			
		1/50	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/2000	1/5000	1/10000	1/50	1/100	1/200
1	Aureus I	+	+	+	+	+	Grenze	+	0	0	0	0
2	„ VIII	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
3	Albus IX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	„ XII	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
5	Citrus XXVI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	„ XXXV	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0

Aus diesen Agglutinationsreihen geht wieder hervor, daß die 3 aus Eiterungen stammenden Staphylokokken (vergl. Tabelle II) sich vollkommen homolog verhalten, nämlich der Aureus I, Albus XII und Citrus XXXV. Die 3 anderen nicht aus Eiterungen stammenden Traubkokken (VIII, IX, XXVI) sind sowohl von den ersten 3 artverschieden, wie die Versuche der Tabelle III, V und VI beweisen, als auch untereinander nicht identisch, wie aus Tabelle IV hervorgeht.

Es ergibt sich aus diesen Untersuchungen folgendes Resultat:

1) Gerade wie es z. B. unter den zahlreichen Vibrionen nur einen speziellen *Vibrio cholerae asiaticae* gibt, der allerdings in den einzelnen Stämmen wieder weitgehende morphologische Unterschiede zeigen kann, so findet sich unter den zahlreichen in der Natur vorkommenden Staphylokokken nur eine Art der echten menschenpathogenen

Traubenkokken. Die einzelnen Stämme dieser Art können sich durch verschiedene Farbbildung unterscheiden.

2) Mit Hilfe eines hochwertig agglutinierenden, mit menschenpathogenen Kokken hergestellten Serums ist eine strenge, spezifische Differenzierung der pathogenen und der saprophytischen Traubenkokken möglich.

3) Es gibt leicht und schwer agglutinierbare Staphylokokkenkulturen, die man mit Hilfe der Serumreaktion trotzdem streng differenzieren kann.

4) Auch mit Hilfe der schwer agglutinierbaren, echten menschenpathogenen Staphylokokkenstämme läßt sich ein stark agglutinierendes Serum hervorrufen, welches die echten menschenpathogenen Traubenkokken verschiedener Herkunft agglutiniert. Dagegen gelingt es nicht mit Hilfe der nicht agglutinierten Stämme der saprophytischen Kokken ein Serum herzustellen, welches pathogene Staphylokokken agglutiniert.

5) Die agglutiniert werdenden, also pathogenen Kokken bilden Hämolyisin (Staphylotoxin), die nicht agglutiniert werdenden, saprophytischen Stämme dagegen nicht.

Nachdruck verboten.

Weitere Studien über das Laktoserum.

[Aus dem hygienischen Institute der Universität Graz.]

III. Mitteilung.

Von Dr. **Paul Theodor Müller**, Privatdozent u. Assistent am Institute.

Mit 1 Kurve.

In zwei vorhergehenden Studien über das Laktoserum und dessen kaseinfällende Wirkung¹⁾ suchte ich einerseits näheren Aufschluß über das Wesen dieses Fällungsvorganges und über die Eigenschaften des hierbei entstehenden Reaktionsproduktes zu erlangen, andererseits festzustellen, wie weit das Kasein verändert bzw. gespalten werden kann, ohne seine präzipitinerzeugende Kraft im Organismus einzubüßen. Um nun unsere Kenntnisse über das Laktoserum zu einem gewissen vorläufigen Abschluß zu bringen, erübrigte noch ein genaueres Studium der quantitativen Seite dieses Vorganges und ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit dem, was wir über die anderen verwandten Präzipitinreaktionen in dieser Hinsicht wissen, eine Aufgabe, deren Bearbeitung den Gegenstand der vorliegenden Mitteilung bildet.

I. Die präzipitinbindende Kraft des Kaseins.

Die schönen Untersuchungen von Eisenberg und Volk²⁾ haben gezeigt, daß die Bakterien imstande sind, weit mehr der spezifisch auf sie abgestimmten Agglutinine zu absorbieren als zu ihrer Agglutination erforderlich wäre, daß sie also sich mit Agglutinin zu übersättigen trachten.

Es war von Interesse, zu untersuchen, ob ähnliche Verhältnisse auch bei dem Laktopräzipitin beobachtet werden können und ob also das Kasein ein Vielfaches der zu seiner Fällung erforderlichen Präzipitinmenge zu binden vermag oder nicht.

1) Arch. f. Hyg. Bd. XLIV. 1902. Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXII. 1902.

2) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XL. 1902.

Diese Versuche wurden in folgender Weise angestellt. Je 10 ccm Laktoserum wurden mit steigenden Milchmengen (0,5, 0,75, 1,0, 2,0 etc. bis 8,0 ccm) versetzt, auf 20 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Entstehung des Präzipitates abgewartet¹⁾. Hierauf wurde das letztere durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt. Je 2 ccm

Versuch I.

Serum von 3 Kaninchen, die innerhalb 14 Tagen 40 ccm Milch intraperitoneal erhalten hatten.

Serum	Milch	Bemerkung	Zentrifugat	Milch	
10 ccm + 9,5 ccm H ₂ O	0,5 ccm	Zentrifugat klar	2 ccm	0,1 ccm	Fällung
			2 "	0,2 "	+
			2 "	0,3 "	0
			4 "	0,1 "	Fällung
			6 "	0,1 "	"
			2 "	0,1 "	0
10 ccm + 9,25 ccm H ₂ O	0,75 ccm	klar	2 "	0,2 "	0
			2 "	0,2 "	0
			2 "	0,3 "	0
			4 "	0,1 "	0
			6 "	0,1 "	Fällung
			2 "	0,1 "	0
10 ccm + 9,0 ccm H ₂ O	1,0 ccm	klar	2 "	0,1 "	0
			2 "	0,2 "	0
			2 "	0,3 "	0
			4 "	0,1 "	0
			6 "	0,1 "	0
			2 "	0,1 "	0
10 ccm + 8,0 ccm H ₂ O	2,0 ccm	klar	2 "	0,1 "	0
			2 "	0,2 "	0
			2 "	0,3 "	0
			4 "	0,1 "	0
			6 "	0,1 "	0
			2 "	0,1 "	0
10 ccm + 7,0 ccm H ₂ O	3,0 ccm	klar	2 "	0,1 "	0
			2 "	0,2 "	0
			2 "	0,3 "	0
			4 "	0,1 "	0
			6 "	0,1 "	0
			2 "	0,1 "	0
10 ccm + 6,0 ccm H ₂ O	4,0 ccm	schwach trüb	2 "	0,1 "	0
			2 "	0,2 "	0
			2 "	0,3 "	0
			4 "	0,1 "	0
			6 "	0,1 "	0
			2 "	0,1 "	0
10 ccm Serum + 5 ccm Milch + 5 ccm H ₂ O	Zentrifugat:	trübe			
10 " " + 6 " " + 4 " "		stark trübe			
10 " " + 7 " " + 3 " "		sehr stark milchig getrübt			
10 " " + 8 " " + 2 " "		do.			

Bestimmung der Wirksamkeit des Serums:

1 ccm Serum + 0,2 ccm Milch	} Fällung	
1 " " + 0,4 " "		
1 " " + 0,6 " "		
1 " " + 0,7 " "		
1 " " + 0,8 " "		} 0
1 " " + 0,9 " "		
1 " " + 1,0 " "		

Ergebnis: 0,75 ccm Milch haben aus 10 ccm Serum soviel Präzipitin absorbiert, daß 2 ccm des Zentrifugates (= 1 ccm Serum) nicht mehr 0,1 ccm Milch zu fällen vermochten, d. i., da 10 ccm Serum 7 ccm Milch fällen, etwa das 8-fache derjenigen Präzipitinmenge, welche zur Fällung der 0,75 ccm Milch ausreichte.

1) Gewöhnlich wurden die Proben 1—2 Stunden stehen gelassen.

Versuch II.

Serum von 3 Kaninchen, die innerhalb 14 Tagen 50 ccm Milch intraperitoneal erhalten hatten.

Serum	Milch	Bemerkung	Zentrifugat	Milch			
10 ccm + 9,75 ccm H ₂ O	0,25 ccm	Zentrifugat klar	1 ccm	0,1 ccm	0		
			2 "	0,1 "	Fällung		
			2 "	0,2 "	0		
			2 "	0,3 "	0		
			4 "	0,1 "	Fällung		
10 ccm + 9,5 ccm H ₂ O	0,5 ccm	klar	6 "	0,1 "	"		
			1 "	0,1 "	0		
			2 "	0,1 "	0		
			2 "	0,2 "	0		
			2 "	0,3 "	0		
10 ccm + 9,25 ccm H ₂ O	0,75 ccm	klar	4 "	0,1 "	Fällung		
			6 "	0,1 "	"		
			1 "	0,1 "	0		
			2 "	0,1 "	0		
			2 "	0,2 "	0		
10 ccm + 9,0 ccm H ₂ O	1,0 ccm	klar	2 "	0,3 "	0		
			4 "	0,1 "	0		
			6 "	0,1 "	0		
			1 "	0,1 "	0		
			2 "	0,1 "	0		
10 ccm + 8,0 ccm H ₂ O	2,0 ccm	klar	2 "	0,2 "	0		
			2 "	0,1 "	0		
			2 "	0,1 "	0		
			2 "	0,2 "	0		
			4 "	0,3 "	0		
10 ccm Serum + 3,0 ccm Milch + 7,0 ccm Wasser				Zentrifugat:	6 "	0,1 "	0
					10 "	klar (Spur?)	
					10 "	schwach trüb	
					10 "	stark milchig	
					10 "	sehr stark milchig	

Wirksamkeit des Serums:

1 ccm Serum + 0,3 ccm Milch	} Fällung
1 " " + 0,4 " "	
1 " " + 0,5 " "	
1 " " + 0,6 " "	
1 " " + 0,7 " "	
1 " " + 0,8 " "	0

Ergebnis: 0,5 ccm Milch absorbierten aus 10 ccm Serum soviel Präzipitin, daß 2 ccm Zentrifugat (= 1 ccm Serum) nicht mehr 0,1 ccm Milch fällen konnten: da 10 ccm Serum 6 ccm Milch präzipitieren, somit etwa die 10-fache Präzipitinnmenge von derjenigen, die für die Fällung von 0,5 ccm ausreichte.

derselben, welche also einem Kubikcentimeter des ursprünglichen Laktoserums entsprachen, wurden dann durch Zusatz von 0,1, 0,2 ccm Milch auf die Anwesenheit von Präzipitin geprüft. Gleichzeitig wurde in einer besonderen Versuchsreihe die fällende Kraft des Laktoserums bestimmt (Versuch I u. II).

Hätte nun das zugesetzte Casein nur so viel Präzipitin an sich gerissen als zu seiner Fällung erforderlich war, so hätte also z. B. in Versuch I der Zusatz von 1 ccm Milch zu 10 ccm Laktoserum, welche etwa 7,5 ccm Milch zu fällen vermochten, darin noch solche Mengen

Präzipitin zurücklassen müssen, daß dieselben für 6 ccm Milch noch eben ausreichen. 2 ccm des Zentrifugates (= 1 ccm Serum) hätten dann noch imstande sein müssen, 0,6 ccm Milch zu präzipitieren. Wie aus unseren Versuchen hervorgeht, ist dies jedoch durchaus nicht der Fall. In dem zitierten Beispiele wurde nicht einmal 0,1 ccm Milch mehr durch die 2 ccm des Zentrifugates abgeschieden, womit also bewiesen ist, daß in der Tat weit mehr Präzipitin durch das Kasein absorbiert wird, als dasselbe zu seiner Fällung braucht. Eine annähernde Vorstellung von der Höhe des absorbierten Multiplums gibt die Tatsache, daß 0,5 ccm Milch noch genügend Präzipitin in 10 ccm Serum zurückließen, um 1,0 ccm Milch zu fällen, 0,75 ccm hingegen nicht mehr; die Menge von 0,75 ccm Milch hat somit so viel Präzipitin gebunden, daß davon weniger in unserem Gemisch zurückblieb als für die Fällung von 1 ccm Milch erforderlich wäre, d. i. also mindestens die für 6—6,5 ccm Milch notwendige Präzipitinmenge oder ein etwa 8—10-faches Multiplum. Ähnlich verlief Versuch II¹⁾. Bekanntlich ist die agglutininbindende Kraft der Bakterienleiber eine bei weitem größere. Im wesentlichen verhält sich jedoch, wie wir eben gesehen haben, das Laktopräzipitin in dieser Hinsicht ganz analog wie das Agglutinin, und stimmt auch mit dem von Eisenberg studierten Verhalten anderer Präzipitinarten (die gegen Hühnereiweiß und normales Pferdeserum wirksam waren) aufs beste überein. Erwähnt sei noch, daß nach Versuchen von Ehrlich und Morgenroth auch die Erythrocyten hohe Multipla der zur Lösung ausreichenden Minimaldosis des hämolytischen Zwischenkörpers zu binden vermögen.

II. Wird das Kasein durch Laktoserum stets vollständig gefällt oder nicht?

Eine weitere für das Verständnis des uns beschäftigenden Fällungsvorganges äußerst wichtige Frage ist die, ob derselbe stets zu einer vollkommenen Abscheidung des Kaseins führt, oder ob mehr oder minder große Mengen des letzteren der Fällung entgehen können, ob mit anderen Worten die Fällungsreaktion eine vollständige ist oder nicht.

Schon aus den im vorigen Abschnitte wiedergegebenen Versuchen I und II läßt sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit der Schluß ableiten, daß die Präzipitation besonders bei Zusatz größerer Milchdosen keine vollständige sein kann. Denn während die vom Niederschlage durch die Zentrifuge befreiten Flüssigkeiten vollkommen klar und durchsichtig waren, solange sich die zugesetzten Milchmengen unter einer gewissen Grenze (in unserem Falle unter 4 ccm) hielten, war von dieser Grenze aufwärts eine stets zunehmende, erst opaleszierende, dann milchige Trübung derselben zu beobachten, welche kaum auf etwas anderes zu beziehen sein konnte als auf in Lösung gebliebenes Kasein. Daß diese Vermutung in der Tat zutreffend war, geht aus den folgenden Versuchen (III u. IV) hervor. Die Anordnung desselben war eine ganz ähnliche wie bei Versuch I und II, nur mit dem Unterschiede, daß zu den erhaltenen Zentrifugaten nicht Milch, sondern geringe Mengen (0,05, 0,1, 0,2) von Laktoserum hinzugefügt wurden. Ueberall da nun,

1) Ist die Zeitdauer, während welcher Kasein und Präzipitin aufeinander einwirken, eine längere (12—24 Stunden), so wird das letztere noch vollständiger absorbiert, wie Versuche gezeigt haben.

wo diese Flüssigkeiten klar waren, blieb dieser Zusatz ohne jede Wirkung, war also das Kasein anscheinend vollständig durch das Laktoserum ausgefällt worden; da jedoch, wo die Zentrifugate die erwähnte Trübung aufwiesen, trat sofort Präzipitation ein, ein Beweis dafür, daß dieselben noch deutliche Mengen von Kasein in Lösung enthielten. Zugleich ließ sich zeigen, daß mit der Zunahme der zu dem Laktoserum hinzugefügten Milchmengen und somit auch mit der zunehmenden Trübung der erhaltenen Zentrifugate immer größere Mengen von Laktoserum notwendig wurden, um noch Fällung zu erzeugen; daß mit anderen Worten die in Lösung bleibenden Kaseinmengen hierbei immer größer wurden. Je mehr Kasein also zu dem Laktoserum zugesetzt wird, desto unvollständiger

Versuch III.

Serum von 3 Kaninchen, die innerhalb 14 Tagen 50 ccm Milch intraperitoneal erhalten hatten.

Serum	Milch	Bemerkung	Zentrifugat	Serum	Nach 2 Stunden
10 ccm	1 ccm	klar	2 ccm	0,05 ccm	0
+			2 "	0,1 "	0
9 ccm H ₂ O			2 "	0,2 "	0
			2 "	0,3 "	0
10 ccm	2 ccm	klar	2 "	0,05 "	0
+			2 "	0,1 "	0
8 ccm H ₂ O			2 "	0,2 "	0
			2 "	0,3 "	0
10 ccm	3 ccm	klar	2 "	0,05 "	0
+			2 "	0,1 "	0
7 ccm H ₂ O			2 "	0,2 "	0
			2 "	0,3 "	0
10 ccm	4 ccm	leicht trüb	2 "	0,05 "	Fällung
+			2 "	0,1 "	"
6 ccm H ₂ O			2 "	0,2 "	"
			2 "	0,3 "	"
10 ccm	5 ccm	trüb	2 "	0,05 "	"
+			2 "	0,1 "	"
5 ccm H ₂ O			2 "	0,2 "	"
			2 "	0,3 "	"
10 ccm	6 ccm	stark trüb	2 "	0,05 "	"
+			2 "	0,1 "	"
4 ccm H ₂ O			2 "	0,2 "	"
			2 "	0,3 "	"
10 ccm	7 ccm	milchig getrübt	2 "	0,05 "	0
+			2 "	0,1 "	Fällung
3 ccm H ₂ O			2 "	0,2 "	"
			2 "	0,3 "	"
10 ccm	8 ccm	milchig getrübt	2 "	0,05 "	0
+			2 "	0,1 "	0
2 ccm H ₂ O			2 "	0,2 "	Fällung
			2 "	0,3 "	"

Bestimmung der Wirksamkeit des Serums:

1 ccm Serum + 0,6 ccm Milch	} Fällung
1 " " + 0,7 " "	
1 " " + 0,8 " "	
1 " " + 0,9 " "	
1 " " + 1,0 " "	

Ergebnis: Mit der Zunahme der zugesetzten Milchmenge nimmt auch die in Lösung bleibende Menge zu, so daß also die Fällung immer unvollständiger wird.

Versuch IV.

Serum von 3 Kaninchen, die innerhalb 14 Tagen 40 ccm Milch erhalten hatten.

Serum	Milch	Bemerkung	Zentrifugat	Serum	Nach 2 Stunden
10 ccm + 8 ccm H ₂ O	2 ccm	klar	2 ccm 2 " 2 " 2 "	0,05 ccm 0,1 " 0,2 " 0,3 "	0 0 0 0
10 ccm + 7 ccm H ₂ O	3 ccm	klar	2 " 2 " 2 " 2 "	0,05 " 0,1 " 0,2 " 0,3 "	0 0 0 0
10 ccm + 6 ccm H ₂ O	4 ccm	Spur von Trübung	2 " 2 " 2 " 2 "	0,05 " 0,1 " 0,2 " 0,3 "	Fällung " " "
10 ccm + 5 ccm H ₂ O	5 ccm	trüb	2 " 2 " 2 " 2 "	0,05 " 0,1 " 0,2 " 0,3 "	0 Fällung " "
10 ccm + 4 ccm H ₂ O	6 ccm	stark trüb	2 " 2 " 2 " 2 "	0,05 " 0,1 " 0,2 " 0,3 "	0 0 Fällung "
10 ccm + 3 ccm H ₂ O	7 ccm	stark milchig getrübt	2 " 2 " 2 " 2 "	0,05 " 0,1 " 0,2 " 0,3 "	0 0 0 Fällung

Wirksamkeit des Serums:

1 ccm Serum + 0,4 ccm Milch	} Fällung
1 " " + 0,5 " "	
1 " " + 0,6 " "	
1 " " + 0,7 " "	
1 " " + 0,8 " "	

wird, von einer gewissen Grenze ab, die Fällung; von einer bestimmten, noch größeren Kaseinmenge an bleibt die Fällung schließlich vollkommen aus.

Wir haben somit bei dem Laktoserum zwei verschiedene Grenzpunkte zu unterscheiden: 1) denjenigen, bei welchem das Kasein noch eben anscheinend vollständig ausgefällt wird und 2) denjenigen, bei welchem überhaupt keine sichtbare Abscheidung desselben mehr erfolgt. Der letztere dieser beiden Grenzpunkte ist es, den wir unseren Bestimmungen der „fallenden Kraft“ des Laktoserums in der vorliegenden wie in einer früheren Mitteilung zu Grunde gelegt haben.

Der eben dargelegte Befund steht nun in einem gewissen Widerspruch mit den Beobachtungen, die Eisenberg an den von ihm untersuchten Präzipitinen gemacht hat. Eisenberg¹⁾ schreibt: „Bei jeder Präzipitinreaktion sind neben dem Reaktionsprodukt in der oberen Flüssigkeit Ueberschüsse beider reagierender Substanzen nachweisbar, die nebeneinander reaktionslos koexistieren. Auf Grund eines allgemeinen Gesetzes der chemischen Energetik ist ein Gleichgewichtszustand zwischen den Komponenten des Systems ein-

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902.

getreten und erst durch neuerlichen Zusatz einer der reagierenden Substanzen kann dieser Zustand umgestürzt und die Reaktion wieder in Gang gebracht werden. Durch große Zusätze der einen Substanz kann die Reaktion in der Weise beeinflußt werden, daß die andere bis auf geringe Reste aufgebraucht wird; doch lassen sich selbst dann noch mittels geeigneter Methoden diese Reste nachweisen¹⁾.

Hätten nun diese Beobachtungen Eisenbergs auch für das Laktoserum und dessen Präzipitin ihre Gültigkeit, so wäre demnach zu erwarten, daß sowohl durch Zusatz von Milch als von Serum zu unseren vom Niederschlage befreiten Gemischen neuerdings eine Fällung hervorgerufen würde. Statt dessen haben wir jedoch im Vorhergegangenen gesehen, daß einerseits die klar gebliebenen Zentrifugate mit Serum nicht mehr reagierten und daß andererseits in denjenigen Proben, bei welchen der ursprüngliche Milchezusatz ein größerer war, kein Präzipitin mehr nachgewiesen werden konnte. Da jedoch gegen diese Proben der Einwand erhoben werden konnte, daß die hierbei verwendeten Flüssigkeitsmengen (2 ccm) vielleicht zu geringe waren, um Spuren von Präzipitin oder Kasein zu entdecken und daß ferner auch der Zeitraum von 2 Stunden, nach welchem die Untersuchung vorgenommen wurde, für die Abscheidung dieser geringen Mengen ein zu kurzer war, wurden noch die folgenden Experimente angestellt. Wie früher, wurden zu 10 ccm Serum steigende Mengen von Milch und die zur Ergänzung auf 20 ccm nötige Wassermenge hinzugefügt. Nachdem die Gemische 12 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatten und sich eine möglichst vollständige Abscheidung des Kaseins vollzogen hatte, wurden die Proben gründlich zentrifugiert, die obstehende Flüssigkeit dann, zur Entfernung etwaiger größerer Flöckchen, durch ein Filter durchgeschickt und in toto zu den Versuchen verwendet.

Jene Proben, die ein absolut klares Zentrifugat ergaben, oder nur jene minimale Opaleszenz zeigten, die vielen Seren zukommt, wurden dann mit je 2 ccm Laktoserum versetzt; jene Mischungen, die bereits nach dem Zentrifugieren eine wenn auch nur schwache milchige Opaleszenz aufwiesen, wurden stets doppelt angesetzt, und zwar wurde die eine davon mit 2 ccm Laktoserum, die andere mit 0,05 ccm Milch beschickt; die stärker getrübbten Zentrifugate endlich, deren Kaseingehalt nach ihrem Aussehen und nach dem früher Auseinandergesetzten keinem Zweifel unterliegen konnte, wurden nur durch Milchezusatz auf die Anwesenheit von Präzipitin geprüft. Nach 2, 4 und 24 Stunden wurden die Röhrchen zentrifugiert und daraufhin untersucht, ob sich ein Bodensatz von Kasein gebildet hatte.

Diese Experimente ergaben nun folgendes: Die ursprünglich völlig klaren Flüssigkeiten hatten nach 4-stündigem Kontakt mit dem Laktoserum ihr Aussehen nicht wesentlich verändert, höchstens hatte die erwähnte Opaleszenz um ein eben Merkliches zugenommen. Nach dem Zentrifugieren zeigte sich entweder gar kein Bodensatz oder nur einige minimale weiße Flöckchen, die mit einigem guten Willen noch als Kaseinflöckchen angesprochen werden konnten. Nach 24-stündigem Stehen

1) Analoge Befunde beschreiben Linossier und Lemoine, Compt. rend. de la soc. de biol. 1902; ferner Michaelis und Oppenheimer, Arch. f. Anat. u. Physiologie 1902.

war die Opaleszenz bezw. die Abscheidung des Kaseïns entschieden deutlicher und nicht mehr zweifelhaft, immerhin aber doch noch außerordentlich gering. In den stärker opaleszenten und milchig getrübten Flüssigkeiten hatte sich unter dem Einflusse des Serums, wie zu erwarten war, eine deutliche starke Fällung gebildet, die nach dem Zentrifugieren als weißlicher Belag an der Kuppe des Reagenzglases haftete.

Der Milchzusatz zu diesen an und für sich schon kaseinhaltigen Proben war jedoch ganz erfolglos geblieben (Versuch V—VII).

Versuch V.

Serum von 3 Kaninchen, die innerhalb 14 Tagen 50 ccm Milch intraperitoneal erhalten hatten.

Grenze der Wirksamkeit: 1 ccm Serum fällt noch 0,7 ccm Milch, nicht mehr 0,8 ccm.

Serum	Milch	Wasser		Zentrifugat	+ 0,05 ccm Milch	+ 2 ccm Serum
10 ccm	1,0 ccm	9,0 ccm	Fällung	klar	—	Spur (?)
10 "	2,0 "	8,0 "	"	"	—	"
10 "	3,0 "	7,0 "	"	Spur	0	geringe " Fällung
10 "	4,0 "	6,0 "	"	Opaleszenz leicht trüb	0	starke Fällung
10 "	5,0 "	5,0 "	"	stark trüb	0	" "
10 "	6,0 "	4,0 "	"	stark milchig	0	" "

Versuch VI.

Serum von 3 Kaninchen, die innerhalb 14 Tagen 30 ccm Milch erhalten hatten.

Grenze: 1 ccm Serum fällt 0,2 ccm Milch, nicht mehr 0,3 ccm.

Serum	Milch	Wasser		Zentrifugat	+ 0,05 ccm Milch	+ 2 ccm Serum
10 ccm	0,4 ccm	9,6 ccm	Fällung	klar	geringe Fällung	0
10 "	0,6 "	9,4 "	"	Spur	Spur (?)	Spur
10 "	1,0 "	9,0 "	"	Opaleszenz leicht trüb	0 (Spur?)	geringe Fällung
10 "	2,0 "	8,0 "	"	stark trüb	0 (Spur?)	starke Fällung
10 "	3,0 "	7,0 "	0	—	—	—

Versuch VII.

Serum von 3 Kaninchen, die innerhalb 14 Tagen 50 ccm Milch intraperitoneal erhalten hatten.

Grenze: 1 ccm Serum fällt noch 0,7 Milch, nicht mehr 0,8 ccm.

Serum	Milch	Wasser		Zentrifugat	+ 0,05 ccm Milch	+ 2 ccm Serum
10 ccm	0,6 ccm	9,4 ccm	Fällung	klar	—	0
10 "	1,0 "	9,0 "	"	"	0	0 (Spur?)
10 "	1,5 "	8,5 "	"	"	0	0 (Spur?)
10 "	2,0 "	8,0 "	"	Spur trüb	0	Spur
10 "	3,0 "	7,0 "	"	trüb	0	starke Fällung
10 "	4,0 "	6,0 "	"	stark trüb	0	sehr starke Fällung
10 "	5,0 "	5,0 "	"	stark milchig	0	—

Es waren somit in allen jenen Proben, bei welchen sich klare Zentrifugate ergeben hatten und somit das zu-

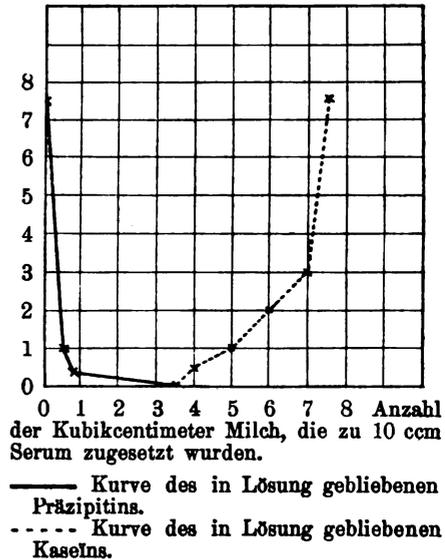
gesetzte Milchquantum unter jenem erwähnten Grenzwerte geblieben war, bestenfalls nur minimale Mengen von Kasein nachzuweisen. Alle Röhrchen hingegen mit höherem Milchzusatz enthielten zwar reichlich Kasein, aber keine oder höchstens ganz minimale Spuren von freiem (durch weiteren Milchzusatz nachweisbarem) Präzipitin. Eine Zone also, innerhalb welcher, wie bei den von Eisenberg studierten Präzipitinen, fallende und fallbare Substanz in größerer Menge frei nebeneinander bestehen, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen, ist bei dem Laktoserum nicht deutlich ausgeprägt. Es ist vielmehr die Fällung des Kaseins auch bei geringem Präzipitinüberschuß stets eine fast vollständige.

Um allen Mißverständnissen vorzubeugen, möchte ich hier sofort bemerken, daß ich weit davon entfernt bin, hierin einen wesentlichen Unterschied zwischen dem Laktopräzipitin und den anderen Präzipitintarten zu sehen. Dann ist es ja sehr naheliegend, die größere Vollständigkeit der Laktoserumfällung (einen geringen Präzipitinüberschuß vorausgesetzt) gegenüber den anderen spezifischen Fällungsreaktionen sich einfach dadurch zu erklären, daß dem Laktopräzipitat eine geringere Löslichkeit zukommt als den anderen Eiweißfällungen; ist es ja doch ein allgemeines Grundgesetz der Chemie, daß unter sonst ähnlichen Verhältnissen diejenigen Reaktionen am vollständigsten verlaufen, deren Reaktionsprodukt am unlöslichsten ist. Diese Annahme hat aber um so größere Wahrscheinlichkeit für sich, als ja der eine Bestandteil des Laktopräzipitates, nämlich das Kasein, durch die verschiedensten Agentien außerordentlich leicht aus seiner Lösung abgeschieden werden kann; jedenfalls viel leichter als die meisten anderen Eiweißkörper.

Das von uns beobachtete Verhalten des Laktoserums gegenüber dem Kasein steht somit von diesem Gesichtspunkte aus gar nicht im Widerspruche mit den Eisenbergschen Befunden, sondern ordnet sich denselben als spezieller extremer Grenzfall unter. Die minimalen Kaseinmengen, die, wie wir gesehen haben, auch in den klaren Proben enthalten sind, bestätigen diese Auffassung vollkommen. Will man die so gewonnenen Ergebnisse in Kurvenform übersichtlicher darstellen, so kann man etwa folgendermaßen verfahren. Man wähle als Abscisse die Anzahl der Kubikcentimeter Milch, welche zu 10 ccm des Laktoserums hinzugefügt wurden. Als Ordinaten werden einerseits die Kaseinmengen, andererseits die Präzipitinmengen aufgetragen, welche nach Abzentrifugieren des entstandenen Laktopräzipitates noch in Lösung nachzuweisen sind. Ein Maß für die ersteren besitzen wir in der Menge Laktoserum, welche diese Caseinmengen eben zu fällen vermag; umgekehrt messen wir die zurückgebliebenen Präzipitinquantum durch die Milchmengen, mit welchen dieselben noch eine Fällung zu geben vermögen, d. i. durch ihre obere Fällungsgrenze. Ein bestimmtes Quantum Präzipitin und die von demselben eben noch gefällte Milchmenge kommen also in unserer Kurve durch gleiche Ordinatenhöhen zum Ausdruck.

Der Anfangspunkt der Präzipitinkurve wird durch die „fallende Kraft“ des betreffenden Serums repräsentiert (in Versuch I, der dieser Kurve zu Grunde gelegt ist, also durch die Milchmenge von 7,5 ccm). Der Endpunkt derselben (Ordinate 0) liegt nach dem früher Auseinandergesetzten da, wo die erhaltenen Zentrifugate sich zu trüben beginnen,

also in unserem Beispiel zwischen 3 und 4 ccm Milch. Eben hier befindet sich auch der Anfang der Kaseinkurve (Ordinate 0), da die erwähnten Spuren von Kasein, welche sich auch in den klaren Zentrifugaten nachweisen lassen, natürlich zu gering sind, um in dieser Darstellung zum Ausdruck zu kommen. Der Endpunkt der Kaseinkurve ist dadurch gegeben, daß von der oberen Fällungsgrenze ab alles Kasein in Lösung bleibt; es ist also die zu der Abszisse 7,5 gehörige Ordinate ebenfalls gleich 7,5. Einzelne zwischen diesen Grenzpunkten gelegene Werte ergeben sich aus Versuch I und Versuch IV, welche je mit gleich stark wirksamen Serummischungen angestellt wurden und daher wohl ohne weiteres miteinander verglichen werden können. Natürlich beansprucht die so erhaltene Kurve nicht mehr, als ein ungefähres Bild von den quantitativen Verhältnissen bei der Laktoserumfällung zu geben. Für eine wirklich exakte Ermittlung des diesen Verhältnissen zu Grunde liegenden Gesetzes reicht hingegen weder die Zahl der gewonnenen Werte noch auch, wie aus dem folgenden Abschnitte deutlicher hervorgehoben wird, die angewendete Methodik aus. Es lag jedoch die Lösung dieser Aufgabe auch gar nicht im Plane der vorliegenden, mehr orientierenden Versuche.



III. Die partielle Fällung des Kaseins durch Laktoserum.

Fassen wir nunmehr unsere bisherigen Versuchsergebnisse über den quantitativen Verlauf der Laktoserumfällung zusammen, so können wir dieselben folgendermaßen darstellen. Bei Zusatz steigender Milchmengen zu einem gegebenen Quantum Laktoserum beobachtet man zunächst eine Zone, innerhalb welcher das Kasein bis auf Spuren vollständig gefällt wird. Da das Kasein viel größere Präzipitinmengen absorbiert, als zu seiner Fällung erforderlich sind, so finden sich in den hierbei erhaltenen klaren Filtraten nur geringe Mengen desselben vor neben den erwähnten Spuren von Kasein. Steigert man die zugesetzte Milchmenge weiter, so bleiben von einer gewissen Grenze ab immer größere Kaseinmengen in Lösung; daneben finden sich nur Spuren freien Präzipitins. Endlich erreicht man eine weitere Grenze, bei der überhaupt keine Fällung mehr zu beobachten ist.

Es trat nun die Aufgabe an uns heran, die Vorgänge bei dieser unvollständigen Fällung, die sich zwischen den beiden genannten Grenzwerten abspielt, näher zu untersuchen. Vor allem war es von Interesse, zu ermitteln, welche Mengen Laktoserum zur vollständigen Fällung des in Lösung gebliebenen Kaseins erforderlich sind und ob man verschiedene Serummengen benötigt, wenn man einerseits eine bestimmte Milchquantität durch sofortigen Zusatz

der gesamten erforderlichen Serummenge ausfällt, und andererseits zuerst eine partielle Fällung erzeugt, welche man erst durch weiteren Zusatz von Serum zu dem trüben Zentrifugat vervollständigt. Denn da, wie wir im vorigen gesehen haben, das Kasein bei seiner Fällung im stande ist, viel mehr Präzipitin zu binden, als unbedingt zu seiner Abscheidung erforderlich ist, so kann es durchaus nicht als selbstverständlich angesehen werden, daß die beiden genannten Wege zu demselben Resultate führen.

Die Versuchsordnung war folgende: Wie früher, wurden je 5 ccm Laktoserum mit steigenden Milchmengen versetzt und auf 10 ccm Gesamtflüssigkeit ergänzt. Nach 2-stündigem Stehen wurden die Proben zentrifugiert und einerseits die „untere Fällungsgrenze“ bestimmt, bei welcher eben noch vollständige Abscheidung des Kaseins erzielt worden und somit das erhaltene Zentrifugat klar war, andererseits je 1 ccm der trüben Zentrifugate mit steigenden Serumengen zusammengebracht. Nach etwa $\frac{1}{3}$ Stunde wurden die letzteren Proben neuerdings ausgeschleudert und beobachtet, bei welchem Serumzusatz das noch in Lösung befindliche Kasein eben vollkommen ausgefällt war¹⁾; durch Multiplikation mit 10 erhielt man aus dem beobachteten Serumwerte jene Menge, welche zur Abscheidung des gesamten, der ersten Fällung entgangenen Kaseins erforderlich war, und dieser Wert, um 5 (d. i. die ursprünglich verwendete Serummenge) vermehrt, ergab die gesamte zur Fällung verbrauchte Serumquantität.

Diejenige Serummenge, welche erforderlich war, die gleiche Milchmenge auf einmal zu fällen, ergab sich auf einfache Weise durch Umrechnung aus der genannten „unteren Fällungsgrenze“.

Vergleichen wir nun die aus Versuch VIII sich ergebenden und in Tabelle IX übersichtlich zusammengestellten Werte der Serumengen miteinander, welche bei den beiden in Rede stehenden Fällungsverfahren zur Abscheidung gleich großer Milchquanta erforderlich waren, so sehen wir, daß die Unterschiede nur ganz unbedeutende sind und daß somit beide Arten der Fällung, die sofortige totale und die fraktionierte, in 2 Abschnitten sich vollziehende, ungefähr gleich große Mengen von Laktoserum benötigten. Wenn nun auch schon dieser Versuch die Existenz bedeutenderer, sofort in die Augen springender Differenzen mit Sicherheit auszuschließen gestattet, so könnten doch noch immerhin kleinere, konstant in dieselbe Richtung fallende Unterschiede bei den beiden Fällungsverfahren bestehen. Da nämlich die Auffindung der Grenze, von welcher ab die Zentrifugate sich zu trüben beginnen, begrifflicherweise mit unvermeidlichen Beobachtungsfehlern verknüpft ist, und da überdies dieser Fehler bei obiger

1) Zeigt das Serum, wie dies nicht selten der Fall ist, an und für sich schon einen gewissen Grad von Opaleszenz oder Trübung, so sind auch die bei vollkommener Ausfällung des Kaseins erhaltenen Zentrifugate nicht immer ganz klar; man muß dann jene Grenze feststellen, von welcher ab die Trübung eben zuzunehmen beginnt, was bei einiger Uebung und bei günstiger Beleuchtung keine besonderen Schwierigkeiten hat. Um übrigens Selbsttäuschungen nach Möglichkeit auszuschließen, habe ich stets die Röhrchen in der Weise nach ihrem Trübungsgrade geordnet, daß ich ihre Etiquettierung zugedeckt hielt und also nicht wissen konnte, welche Probe ich vor mir hatte; überdies wurde dieses Verfahren stets 2—3mal wiederholt.

Versuch VIII.

Serum	Milch	Bemerkung.	Zentrifug.	Serum		Zentrifugat
5 + 2,5 H ₂ O	2,5 ccm	Zentrifugat klar (Grenze: 2,75 ccm)	—	— — — —	— — — —	— — — —
5 + 2 H ₂ O	3,0 ccm	Spur von Trübung	je 1 ccm	0,05 ccm 0,1 " " " " 0,15 " " " " 0,2 " " " "	Fällung " " " "	trüb klar " " " "
5 + 1,5 H ₂ O	3,5 ccm	stark trüb	do.	0,05 " " " " 0,1 " " " " 0,15 " " " " 0,2 " " " "	" " " "	trüb Spur getrübt klar " " " "
5 + 1,0 H ₂ O	4,0 ccm	stark milchig getrübt	do.	0,1 " " " " 0,2 " " " " 0,25 " " " " 0,3 " " " "	" " " "	trüb Spur klar " " " "
5 + 0,5 H ₂ O	4,5 ccm	do.	do.	0,1 " " " " 0,2 " " " " 0,25 " " " " 0,35 " " " "	" " " "	trüb schwach trüb Spur klar " " " "
5 + θ	5,0 ccm	do.	do.	0,2 " " " " 0,3 " " " " 0,4 " " " " 0,45 " " " "	" " " "	trüb " " " " Spur klar " " " "
5 + 1,5 H ₂ O	5,5 ccm	sehr stark milchig getrübt	je 1,2 ccm	0,4 " " " " 0,5 " " " " 0,55 " " " " 0,6 " " " "	" " " "	trüb Spur von Trüb. klar " " " "
5 + 1,0 H ₂ O	6,0 ccm	do.	do.	0,5 " " " " 0,6 " " " " 0,65 " " " " 0,7 " " " "	" " " "	trüb Spur trüb klar " " " "
5 + 0,5 H ₂ O	6,5 ccm	do.	do.	0,6 " " " " 0,7 " " " " 0,75 " " " " 0,8 " " " "	" " " "	trüb Spur klar " " " "

Tabelle IX.

Die zur Fällung von x ccm Milch nötige Serummenge in ccm

Milch	bei sofortigem Zu- satz der ganzen Menge	bei fraktioniertem Zusatz
2,5 ccm	5,0 ccm	5,0 ccm
3,0 "	5,4 "	5,75 "
3,5 "	6,3 "	6,25 "
4,0 "	7,2 "	7,2 "
4,5 "	8,1 "	8,0 "
5,0 "	9,1 "	9,25 "
5,5 "	9,95 "	10,25 "
6,0 "	10,9 "	11,25 "
6,5 "	11,8 "	12,25 "

Berechnung sich verzehnfacht, so sind die erhaltenen Serumwerte natürlicherweise mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, welche sich jedoch

durch Vergrößerung der benutzten Flüssigkeitsmengen bis zu einem gewissen Grade herabdrücken läßt. Es wurden daher noch die folgenden Versuche (X—XIII) angestellt, bei welchen etwas größere Zentrifugatmengen in Verwendung kamen. Auch hier zeigte sich im allgemeinen wieder eine recht gute Uebereinstimmung zwischen den zur totalen Fällung auf den beiden verschiedenen Wegen erforderlichen Serumengen. Etwas

Versuch X.

Serum von 3 Kaninchen, die innerhalb 14 Tagen 40 ccm Milch erhalten hatten.

A

Serum	Milch	Wasser	Nach 2 Stunden zentrifugiert
5 ccm	0,5 ccm	4,5 ccm	leicht opaleszent
5 "	1,0 "	4,0 "	unverändert leicht opaleszent
5 "	1,1 "	3,9 "	
5 "	1,2 "	3,8 "	Spur "stärker opaleszent" (?) (Grenze 1,2 ccm)
5 "	1,3 "	3,7 "	deutlich trüb
5 "	1,4 "	3,6 "	stärker trüb
5 "	1,5 "	3,5 "	noch stärker trüb

B

30 ccm Serum + 15 ccm Milch + 15 ccm Wasser.

Zentrifugat	Serum	Nach 2 Stunden zentrifugiert
5 ccm	2,5 ccm	trüb
5 "	2,6 "	leicht opaleszent (Grenze 2,55 ccm)
5 "	2,7 "	" " (etwas weniger)
5 "	2,8 "	unverändert
5 "	2,9 "	"

Serummenge für { bei sofortiger Totalfällung 10,25 ccm
2,5 ccm Milch { bei Fraktionsfällung 10,1 "

Versuch XI.

A

Serum von 4 mit Milch vorbehandelten Hasen.

Serum	Milch	Wasser	Zentrifugiert nach 2 Stunden
5 ccm	1,55 ccm	3,45 ccm	klar
5 "	1,6 "	3,4 "	"
5 "	1,65 "	3,35 "	"
5 "	1,70 "	3,3 "	"
5 "	1,75 "	3,25 "	Spur? (Grenze 1,72 ccm)
5 "	2,0 "	3,0 "	leicht trüb
5 "	2,5 "	2,5 "	stärker trüb

B

25 ccm Serum + 20 ccm Milch + 5 ccm H₂O.

Zentrifugat	Serum	Zentrifugiert nach 2 Stunden
5 ccm	3,6 ccm	klar
5 "	3,4 "	"
5 "	3,2 "	Spur (Grenze 3,2 ccm)
5 "	3,0 "	deutliche Spur
5 "	2,8 "	sehr geringe Trübung
5 "	2,6 "	trüb

Serummenge für { a) bei sofortiger Totalfällung 11,7 ccm
4 ccm Milch { b) " fraktionierter Fällung 11,4 "

Versuch XII.

A Serum von 4 mit Milch behandelten Hasen.

Serum	Milch	Wasser	Nach 2 Stunden zentrifugiert
2 ccm	0,6 ccm	1,4 ccm	klar
2 "	0,7 "	1,3 "	"
2 "	0,8 "	1,2 "	" (?) (Grenze 0,8 ccm)
2 "	0,9 "	1,1 "	Spur trüb
2 "	1,0 "	1,0 "	deutlich trüb
2 "	1,1 "	0,9 "	stärker "
2 "	1,2 "	0,8 "	" "
2 "	1,3 "	0,7 "	" "

B 30 ccm Serum + 20 cm Milch + 10 ccm H₂O.

Zentrifugat	Serum	Nach 2 Stunden zentrifugiert
4 ccm	0,7 ccm	trüb
4 "	0,8 "	schwach trüb
4 "	0,9 "	"
4 "	1,0 "	Spur trüb (Grenze 1,05 ccm)
4 "	1,1 "	klar?
4 "	1,2 "	"
4 "	1,3 "	klar
4 "	1,4 "	"
4 "	1,5 "	"

Serummenge für { a) bei sofortiger Totalfällung 8,2 ccm
 3,3 ccm Milch { b) „ fraktionierter Fällung 7,6 „

Versuch XIII.

A Serum von 5 mit Milch vorbehandelten Kanincheu.

Serum	Milch	Wasser	Nach 2 Stunden zentrifugiert
2 ccm	0,5 ccm	1,5 ccm	klar
2 "	0,6 "	1,4 "	"
2 "	0,7 "	1,3 "	"
2 "	0,8 "	1,2 "	leicht trüb (Grenze 0,75 ccm)
2 "	0,9 "	1,1 "	stärker trüb
2 "	1,0 "	1,0 "	" "
2 "	1,1 "	0,9 "	" "
2 "	1,2 "	0,8 "	" "

B 25 ccm Serum + 7,5 ccm H₂O + 17,5 ccm Milch.

Zentrifugat	Serum	Nach 4 Stunden zentrifugiert
4 ccm	0,6 ccm	stark trüb
4 "	0,8 "	" "
4 "	1,0 "	" "
4 "	1,2 "	schwach trüb
4 "	1,4 "	" "
4 "	1,6 "	Spur stärker wie die folgende (?) Probe
4 "	1,8 "	opaleszent (Grenze 1,7 ccm)
4 "	2,0 "	unverändert opaleszent

Serummenge für { a) bei sofortiger Totalfällung 9,32 ccm
 3,5 ccm Milch { b) „ fraktionierter Fällung 9,25 „

größer waren die Differenzen nur bei Versuch XII, wo zur fraktionierten Fällung 0,6 ccm Laktoserum weniger

erforderlich waren als zur einzeitigen totalen Abscheidung des Kaseins. Auch bei den anderen Versuchen lagen übrigens die Differenzen stets nach derselben Richtung und niemals war die zur fraktionierten Fällung gebrauchte Serummenge größer als die andere. Daß es sich hierbei nicht um einen Zufall des Experiments handelt haben dürfte, geht aus der Wiederholung dieser Versuche hervor, welche stets ein identisches Resultat ergaben. Wir werden auf diese anscheinend paradoxe Tatsache, daß die fraktionierte Fällung zuweilen eher etwas geringere Serumengen erfordert, als die sofortige Totalfällung, und auf ihre mutmaßliche Erklärung noch in dem nächsten Abschnitte dieser Abhandlung zurückzukommen haben.

Nach dem eben Dargelegten können wir somit behaupten, daß die zur fraktionierten Fällung einer bestimmten Kaseinmenge erforderliche Serumquantität jedenfalls nicht größer ist als jene, welche zur sofortigen totalen Abscheidung derselben eben hinreicht. Daraus folgt aber mit Notwendigkeit weiter, daß auch der in der ersten Fraktion ausfallende Kaseinanteil höchstens diejenige Präzipitinmenge absorbiert haben kann, welche zu seiner totalen Fällung eben nötig war.

Ist es nun möglich, so wollen wir uns weiter fragen, auf Grund der bis jetzt bekannten Daten die Kaseinmengen zu berechnen, welche bei der partiellen Fällung abgeschieden werden. Die Größen, die uns zu dieser Berechnung zur Verfügung stehen, sind: 1) diejenige Serummenge, welche die gesamte Kaseinmenge abzuschneiden vermag, und 2) diejenige, welche den in Lösung gebliebenen Anteil des Kaseins ausfällt. Können wir nun, etwa durch einfache Subtraktion der zweiten Größe von der ersten, die dem gefällten Anteil entsprechende Präzipitinmenge ermitteln?

Um diese Frage zu beantworten, müssen wir folgende Ueberlegung anstellen. Wir haben zwar im zweiten Abschnitte dieser Arbeit gesehen, daß die kaseinhaltigen Zentrifugate, die durch partielle Ausfällung des Kaseins erhalten werden, kein (oder nur spurenweise) freies Präzipitin enthalten. Wenn nun aber Kasein und Präzipitin, wie gesagt, nicht frei nebeneinander in Lösung zu bestehen vermögen, so ist damit natürlich nicht ausgeschlossen, daß unter Umständen eine Verbindung beider gelöst bleiben kann. Daß diese Möglichkeit in der Tat besteht, beweist schon das bereits mehrfach erwähnte Ausbleiben jeder Fällung¹⁾ bei Ueberschreitung der „oberen Grenze“ des Milchzusatzes. Hierbei ist das Präzipitin sicher nicht im freien Zustande vorhanden, sondern an Kasein gebunden, da sonst weiterer Kaseinzusatz eben eine Fällung hervorrufen müßte, was nicht der Fall ist. Ueberdies kann man durch Essigsäurezusatz nicht nur das Kasein, sondern gleichzeitig auch das Präzipitin aus dem Gemisch entfernen, während, wie ich in einer früheren Arbeit zeigen konnte, das freie Präzi-

1) Es sei hier besonders hervorgehoben, daß auch Eisenberg bei seinen Präzipitinstudien gefunden hat, daß ein Ueberschuß präzipitabler Substanz das Auftreten der Reaktion hemmt, und daß dieser Autor ebenfalls annimmt, „daß der spezifische Niederschlag bis zu einem gewissen Grade im Ueberschusse der Eiweißlösung löslich ist, etwa wie Alkalbuminat mit Säuren Niederschlag gibt, der sich im Ueberschuß der Säure auflöst“. (Bullet. de l'acad. scienc. de Cracovie. 1902. Mai.) Aehnliches berichtet Camus. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1902.)

pitin (auch bei Gegenwart von Parakasein) nicht durch Essigsäure gefällt wird. Es ist somit zweifellos, daß die in diesem Gemische enthaltene Verbindung von Kasein und Präzipitin löslicher Natur ist.

Unter diesen Umständen liegt aber die Vermutung äußerst nahe, daß auch in jenen Proben, bei welchen eine unvollständige Fällung des Kaseins stattgefunden hatte, nicht reines Kasein, sondern eine derartige Verbindung von Kasein und Präzipitin in Lösung geblieben ist. Ist dem so, dann kann aber begreiflicherweise der Kaseingehalt dieser Zentrifugate durch Serumzusatz gar nicht ermittelt werden, da wir ja die in Lösung gehaltene Präzipitinmenge nicht kennen und nur bestimmen, wie viel Präzipitin zur vollkommenen Fällung fehlt: das ist die Differenz der zur Fällung erforderlichen und der tatsächlich vorhandenen Präzipitinmenge ermitteln. Aus dem oben Gesagten geht hervor, daß daher die Berechnung, welche der Konstruktion unserer im zweiten Abschnitte dieser Abhandlung reproduzierten Kaseinkurve zu Grunde gelegt wurde, nicht einwandfrei ist, wenn dieselbe auch immerhin ein ungefähres Bild von dem quantitativen Verlauf der partiellen Fällung zu geben vermag.

IV. Weitere Versuche über die partielle Fällung des Kaseins.

Um nun einen noch genaueren Einblick in die quantitativen Verhältnisse der Laktoserumfällung zu gewinnen und speziell die absoluten Mengen des ausgeschiedenen Kaseins zu bestimmen, wurde der folgende Weg eingeschlagen. Es wurde eine möglichst große Quantität (Serum von 5—6 Tieren) Laktoserum gesammelt und nach gründlicher Durchmischung dessen Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Ebenso wurde der N-Gehalt einer größeren Portion Milch, welche für die ganze Versuchsreihe ausreichend war, festgestellt.

Hierauf wurden zu je 5 ccm Serum, wie früher, steigende Milchmengen hinzugefügt, nach erfolgter Fällung (ca. 2 Stunden) zentrifugiert, und in 5 ccm der mehr minder milchig getrübbten Flüssigkeit der Stickstoffgehalt bestimmt. Die Differenz des Gesamtstickstoffes und des — auf Volumen berechneten — Zentrifugatstickstoffes (d) gibt dann die Menge des gefällten (Kasein-) Stickstoffes. Um nun diesen so erhaltenen Wert auf Kubikcentimeter Milch umrechnen zu können, mußte noch folgende Korrektur angebracht werden: da nämlich durch das Laktopräzipitin nicht die gesamte N-Substanz der Milch gefällt wird, sondern im wesentlichen nur das Kasein, so bleibt also ein Teil des Milchstickstoffes hierbei in Lösung, und dieser Anteil muß proportional der gefällten Milchmenge sein. Seien also z. B. x die Anzahl der Kubikcentimeter Milch, deren Kasein gefällt worden ist, so ist ax deren gesamter N-Gehalt und bx jene N-Menge, die hierbei in Lösung geblieben ist. Die Differenz dieser beiden Werte: ax — bx ist dann gleich dem Stickstoff (d) des gefällten Kaseins, also jenem Werte, den wir experimentell ermittelt haben. Da wir nun a, den Stickstoffgehalt der Milch, kennen, b aber leicht bestimmen können, so ergibt sich x einfach aus der Gleichung

$$d = ax - bx$$

$$x = \frac{d}{a - b}.$$

Da der nicht auf Kasein zu beziehende Teil des Milchstickstoffes

bekanntlich ca. 10 — 16 Proz. beträgt, so hätten wir b einfach als = 10 — 16 setzen können. Wir zogen es jedoch vor, b direkt dadurch zu ermitteln, daß wir zu 5 ccm Serum ein Milchquantum hinzusetzten, welches sicher total gefällt wurde, und in dem klaren Zentrifugat den N bestimmten. Die Differenz zwischen dem Gesamt-N und dem Zentrifugat-N gab hier, wo alles Casein entfernt war, direkt den in Lösung gebliebenen Anteil des Stickstoffes. Wie man aus den Versuchsprotokollen ersehen wird, stimmt der so erhaltene Wert übrigens meistens ziemlich gut mit dem obigen überein.

Versuch XIV.

Serum von 5 Kaninchen, welche innerhalb 14 Tagen je 40 ccm Milch intraperitoneal erhalten hatten.

Klalgrenze für 2 ccm Serum: 0,6 ccm Milch.

a) 4 ccm Milch = 18,00 ccm NaOH

1 " " = 4,50 " "

b) 5 " Serum = 40,35 " "

I. 5 ccm Serum + 1,5 ccm Milch + 3,5 ccm H₂O; Zentrifugat klar.

Totale Fällung des Kaseins.

Ges.-N (5 ccm Serum + 1,5 ccm Milch)	47,10 ccm NaOH	} Gefällt: das Kasein von 1,5 ccm Milch.
N des Zentrifugates	42,00 " "	
N gefällt	5,10 ccm NaOH	

Von 1,5 ccm Milch somit in Lösung geblieben $6,75 - 5,10 = 1,65$ ccm NaOH für 1 " " " " " " " = 1,0 " " " 1)

II. 5 ccm Serum + 1,75 + 3,25 H₂O; Zentrifugat leicht trüb.

Ges.-N	48,22 ccm NaOH	} Gefällt: das Kasein von 1,3 ccm Milch.
N des Zentrifugates	43,70 " "	
N gefällt	4,52 ccm NaOH	
Korrektur $4,52 = 4,5 x - 1,0 x$		
$= 3,5 x$		
$x = \frac{4,52}{3,5} = 1,3$ ccm		

III. 5 ccm Serum + 2,0 ccm Milch + 3,0 ccm H₂O; Zentrifugat stärker trüb.

Ges.-N	49,25 ccm NaOH	} Gefällt: das Kasein von 1,3 ccm Milch.
N des Zentrifugates	44,60 " "	
N gefällt	4,65 ccm NaOH	
Korrektur $4,65 = 3,5 x$		
$x = \frac{4,65}{3,5} = 1,3$ ccm		

IV. 5 ccm Serum + 2,25 ccm Milch + 2,75 ccm H₂O; Zentrifugat stark trüb.

Ges.-N	50,48 ccm NaOH	} Gefällt: das Kasein von 0,9 ccm Milch.
N des Zentrifugates	47,30 " "	
N gefällt	3,18 ccm NaOH	
Korrektur $3,18 = 3,5 x$		
$x = \frac{3,18}{3,5} = 0,9$ ccm		

V. 5 ccm Serum + 2,5 ccm Milch + 2,5 ccm H₂O.

Ges.-N	51,60 ccm NaOH	} Gefällt: das Kasein von 0,4 ccm Milch.
N des Zentrifugates	50,16 " "	
N gefällt	1,44 ccm NaOH	
Korrektur $1,44 = 3,5 x$		
$x = \frac{1,44}{3,5} = 0,41$ ccm		

1) Dieser Wert ist auffallend hoch (22 Proz. des Ges.-N der Milch).

VI. 5 ccm Serum + 3,0 ccm Milch + 2,0 ccm H₂O.

Ges.-N	53,85 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	53,50 „ „	
N gefällt	0,35 ccm NaOH	
Korrektur	0,35 = 3,5 x	} Gefällt: das Kasein von 0,1 ccm Milch.
	x = 0,1 ccm	

VII. 5 ccm Serum + 3,5 ccm Milch + 1,5 ccm H₂O: Fällung?

Ges.-N	56,10 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	55,80 „ „	
N gefällt	0,30 ccm NaOH	
Korrektur	0,3 = 3,5 x	} Gefällt: das Kasein von 0,08 ccm Milch
	0,3	
	x = $\frac{0,3}{3,5} = 0,08$ ccm	

Versuch XV.

Serum von 6 Kaninchen, die innerhalb 3 Wochen 50 ccm Milch intraperitoneal erhalten hatten.

Klalgrenze des Serums: 0,8 — 0,85 ccm Milch (für 2 ccm Serum).

- a) 3 ccm Milch = 12,63 ccm NaOH
- 1 „ „ = 4,21 „ „
- b) 2 „ Serum = 14,28 „ „
- 1 „ „ = 7,14 „ „

I. 5 ccm Serum + 2 ccm Milch + 3 ccm H₂O; Zentrifugat vollkommen klar.
Totale Fällung des Kaseins.

Ges.-N (5 ccm Serum + 2 ccm Milch)	44,12 ccm NaOH	} Gefällt: das Kasein von 2 ccm Milch.
N des Zentrifugates	36,66 „ „	
N gefällt	7,46 ccm NaOH	
Von 2 ccm Milch somit in Lösung geblieben für 1 „ „ „ „ „	8,42 — 7,46 = 0,96 ccm NaOH = 0,40 „ „	

II. 5 ccm Serum + 2,5 ccm Milch + 2,5 ccm H₂O; Zentrifugat leicht trüb.

Ges.-N (5 ccm Serum + 2,5 ccm Milch)	46,23 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	36,96 „ „	
N gefällt	9,27 ccm NaOH	
Korrektur	x = die Milchmenge, deren Kasein gefällt wurde.	} Gefällt: das Kasein von 2,4 ccm Milch.
	9,27 = 4,21 x — 0,48 x	
	= 3,73 x	
	x = $\frac{9,27}{3,73} = 2,4$ ccm	

III. 5 ccm Serum + 3,0 ccm Milch + 2 ccm H₂O; Zentrifugat trübe.

Ges.-N (5 ccm Serum + 3,0 ccm Milch)	48,33 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	38,56 „ „	
N gefällt	9,77 ccm NaOH	
Korrektur	9,77 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 2,4 ccm Milch.
	x = $\frac{9,77}{3,73} = 2,6$ ccm	

IV. 5 ccm Serum + 3,5 ccm Milch + 1,5 ccm H₂O.

Ges.-N (5 ccm Serum + 3,5 ccm Milch)	50,44 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	39,92 „ „	
N gefällt	10,52 ccm NaOH	
Korrektur	10,52 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 2,8 ccm Milch.
	x = $\frac{10,72}{3,73} = 2,8$ ccm	

V. 5 ccm Serum + 4,0 ccm Milch + 1,0 ccm H₂O.

Ges.-N	52,54 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	43,82 „ „	
N gefällt	8,72 ccm NaOH	
Korrektur	8,72 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 2,3 ccm Milch.
	x = $\frac{8,72}{3,73} = 2,3$ ccm	

VI. 5 ccm Serum + 4,5 ccm Milch + 0,5 ccm H₂O.

Ges.-N	54,64 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	47,22 " "	
<hr/>		
N gefällt	7,42 ccm NaOH	
Korrektur	7,42 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 2,0 ccm Milch.
	x = 1,98 ccm	

VII. 5 ccm Serum + 5,0 ccm Milch.

Ges.-N	56,75 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	49,56 " "	
<hr/>		
N gefällt	7,19 ccm NaOH	
Korrektur	7,19 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 1,9 ccm Milch.
	x = 1,92 ccm	

VIII. 5 ccm Serum + 5,5 ccm Milch.

Ges.-N	58,85 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	56,64 " "	
<hr/>		
N gefällt	2,21 ccm NaOH	
Korrektur	2,21 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 0,6 ccm Milch.
	x = 0,59 ccm	

Versuch XVI.

Serum von 6 Kaninchen, die innerhalb 3 Wochen je 60 ccm Milch intraperitoneal erhalten halten.

Klalgrenze für 5 ccm Serum 1,5 ccm Milch.

- a) 5 ccm Milch = 21,17 ccm NaOH
 1 " " = 4,23 " "
 b) 5 " Serum = 36,25 " "

I. 5 ccm Serum + 1,5 ccm Milch + 3,5 ccm H₂O; klar.

Totale Fällung des Kaseins.

Ges.-N	42,59 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	37,00 " "	
<hr/>		
N gefällt	5,59 ccm NaOH	
Von 1,5 ccm Milch somit in Lösung geblieben	6,34 - 5,59 = 0,75 ccm NaOH	
für 1 " " " " " "	= 0,5 " "	

II. 5 ccm Serum + 2,0 ccm Milch + 3,0 ccm H₂O; Zentrifugat trüb.

Ges.-N	44,71 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	38,00 " "	
<hr/>		
N gefällt	6,71 ccm NaOH	
Korrektur	6,71 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 1,8 ccm Milch.
	x = 6,71	
	x = 3,73 = 1,79 ccm	

III. 5 ccm Serum + 2,25 ccm Milch + 2,75 ccm H₂O; Zentrifugat trüb.

Ges.-N	45,76 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	39,20 " "	
<hr/>		
N gefällt	6,56 ccm NaOH	
Korrektur	6,56 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 1,8 ccm Milch.
	x = 6,56	
	x = 3,73 = 1,75 ccm	

IV. 5 ccm Serum + 2,5 ccm Milch + 2,5 ccm H₂O.

Ges.-N	46,82 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	40,86 " "	
<hr/>		
N gefällt	5,96 ccm NaOH	
Korrektur	5,96 = 3,73 x	} Gefällt: das Kasein von 1,6 ccm Milch.
	x = 5,96	
	x = 3,73 = 1,59 ccm	

V. 5 ccm Serum + 2,75 ccm Milch + 2,25 ccm H₂O.

Ges.-N	47,88 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	43,36 " "	
N gefällt	4,52 ccm NaOH	
Korrektur	$4,52 = 3,73 x$	} Gefällt: das Kasein von 1,2 ccm Milch.
	$x = 1,2 \text{ ccm}$	

VI. 5 ccm Serum + 3,0 ccm Milch + 2,0 ccm H₂O.

Ges.-N	48,94 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	46,60 " "	
N gefällt	2,34 ccm NaOH	
Korrektur	$2,34 = 3,73 x$	} Gefällt: das Kasein von 0,6 ccm Milch.
	$x = 0,6 \text{ ccm}$	

VII. 5 ccm Serum + 3,5 ccm Milch + 1,5 ccm H₂O.

Ges.-N	51,05 ccm NaOH	
N des Zentrifugates	50,40 " "	
N gefällt	0,65 " "	
Korrektur	$0,65 = 3,73 x$	} Gefällt: das Kasein von 0,2 ccm Milch.
	$x = 0,17 \text{ ccm}$	

Tabelle XVII.

Serum	Milch	Davon ge- fällt	In Lösung geblieben	Prozent Milch gefällt	Prozent Milch in Lösung
5 ccm	1,5 ccm	1,5 ccm	0 ccm	100	0
5 "	1,75 "	1,3 "	0,45 "	74	26
5 "	2,0 "	1,3 "	0,7 "	65	35
5 "	2,25 "	0,9 "	1,35 "	40	60
5 "	2,5 "	0,4 "	2,1 "	16	84
5 "	3,0 "	0,1 "	2,9 "	3,3	96,7
5 "	3,5 "	0,08 "	3,42 "	2,0	98,0

Tabelle XVIII.

Serum	Milch	Davon ge- fällt	In Lösung geblieben	Prozent Milch gefällt	Prozent Milch in Lösung
5 ccm	2,0 ccm	2,0 ccm	0 ccm	100	0
5 "	2,5 "	2,4 "	0,1 "	96	4
5 "	3,0 "	2,6 "	0,4 "	86	14
5 "	3,5 "	2,7 "	0,8 "	77	23
5 "	4,0 "	2,3 "	1,7 "	57	43
5 "	4,5 "	2,0 "	2,5 "	44	56
5 "	5,0 "	1,9 "	3,1 "	38	62
5 "	5,5 "	0,6 "	4,9 "	10	90

Tabelle XIX.

Serum	Milch	Davon ge- fällt	In Lösung geblieben	Prozent Milch gefällt	Prozent Milch in Lösung
5 ccm	1,5 ccm	1,5 ccm	0 ccm	100	0
5 "	2,0 "	1,8 "	0,2 "	90	10
5 "	2,25 "	1,8 "	0,45 "	80	20
5 "	2,50 "	1,6 "	0,90 "	64	36
5 "	2,75 "	1,2 "	1,55 "	43	57
5 "	3,00 "	0,6 "	2,4 "	20	80
5 "	3,5 "	0,2 "	3,3 "	6	94

In den Tabellen XVII bis XIX finden sich die zahlenmäßigen Ergebnisse der Versuche XIV bis XVI nochmals übersichtlicher zusammengestellt. Der 2. Stab dieser Tabellen enthält die zu 5 ccm Serum hin-

zugefügten, stufenweise ansteigenden Milchmengen in Kubikcentimeter; der 3. die gefällte, der 4. die in Lösung gebliebene Milchmenge, ebenfalls in Kubikcentimeter. Im 5. und 6. Stab sind endlich dieselben Größen in Prozenten der zugesetzten Milchmengen ausgedrückt.

Betrachten wir nun zunächst die 3 letzten Kolumnen, so bemerken wir folgendes: Wir sehen, wie die in Lösung gebliebenen Kaseinmengen von der Klargrenze ab immer größer werden, und zwar sowohl absolut als prozentuell, eine Tatsache, die wir bereits in einem früheren Abschnitte auf anderem Wege gefunden hatten. Mit zunehmendem Milchzusatz wird also die Laktoserumfällung immer unvollständiger. Dementsprechend nimmt, wie Stab 5 zeigt, die prozentische Menge des gefällten Kaseins bei Ueberschreiten der unteren Grenze stetig ab. — Daraus ergibt sich nun aber sofort eine wichtige Schlußfolgerung und zugleich die Beantwortung einer im vorigen Abschnitte aufgeworfenen Frage. Wie wir nämlich daselbst auseinandergesetzt haben, kann das gefällte Kasein höchstens soviel Präzipitin absorbiert haben, als zu seiner Abscheidung eben erforderlich ist. Da nun aber, wie eben gezeigt, mit wachsendem Milchzusatz ein immer kleinerer Bruchteil des Kaseins abgeschieden wird, so folgt daraus, daß gleichzeitig ein immer größerer Bruchteil des vorhandenen Präzipitins in Lösung bleiben muß, und zwar, wie wir schon hervorgehoben haben, nicht in freiem, sondern in gebundenem Zustand.

Es erübrigt noch, die absoluten Mengen der gefällten Milch, die sich in Stab 3 zusammengestellt finden, zu diskutieren. Bei Versuch XVII werden dieselben von der Klargrenze aufwärts immer kleiner und kleiner, bis schließlich keine merkliche Fällung mehr eintritt, die obere Fällungsgrenze also erreicht wird. Etwas verschieden hiervon zeigt sich jedoch der Verlauf der Kaseinabscheidung in Versuch XVIII und XIX, hier nimmt nämlich die gefällte Milchmenge mit steigendem Milchzusatz zunächst noch etwas zu, um erst nach Erreichung dieses Maximums wieder allmählich bis zur Null herabzusinken. Mit anderen Worten: die maximale Milchmenge, die durch eine bestimmte Serumquantität überhaupt gefällt werden kann, ist bei den letzterwähnten Versuchen etwas größer, als diejenige Milchmenge die noch eben **vollkommen** ausgefällt wird, also die Klargrenze bildet; bei den erstbesprochenen Versuchen hingegen fallen diese beiden Größen, die maximale und die vollkommen gefällte Milchmenge, zusammen.

Wir wollen nicht auf die Frage eingehen, wie diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Laktoseren (oder den verschiedenen Milchproben?) zu deuten sind; wir wollen hier nur eine Konsequenz besprechen, die sich aus diesen Tatsachen ergibt und vermutlich die Erklärung für die auffallende, bereits im vorigen Abschnitte mitgeteilte Beobachtung bildet, daß unter Umständen zu fraktionierten, in zwei Zeiten erfolgenden Fällung einer gegebenen Milchmenge weniger Präzipitin erforderlich ist, als zur sofortigen vollkommenen Fällung.

Wenn nämlich, wie wir eben gesehen haben, eine bestimmte Serummenge im stande ist, bei partieller Fällung eine größere absolute Caseinmenge abzuschcheiden, als sie vollkommen (d. i. bis zur Erzielung klarer, caseinfreier Zentrifugate) zu fällen vermag, so ist natürlich umgekehrt zur Fällung ein und derselben Milchquantität eine größere Serumquantität erforderlich, wenn dieselbe totaliter gefällt werden soll, als wenn gleich-

zeitig noch ein bestimmter Milchüberschuß vorhanden ist, der in Lösung bleibt, wobei also zwar nur eine partielle Fällung eintritt, aber doch dieselbe absolute Kaseinquantität niedergeschlagen wird. Da nun in dem Falle der fraktionierten Fällung, wie wir sie im vorigen Abschnitte ausgeführt haben, die erste Fraktion durch partielle Abscheidung entsteht, und nur die zweite Fraktion vollkommen, ohne Rest, ausgefällt werden muß, so ist klar, daß nach dem eben Auseinandergesetzten die im ganzen bei diesem Verfahren verbrauchte Serummenge geringer sein muß resp. sein kann, als wenn das ganze Kasein auf einmal vollständig entfernt wird, eine Folgerung, die mit den beobachteten Tatsachen bestens übereinstimmt.

Fassen wir die Hauptergebnisse dieser Arbeit nochmals kurz zusammen:

1) Das Kasein vermag unter günstigen Umständen weit mehr Präzipitin zu binden, als zu seiner Fällung erforderlich ist.

2) Bei stufenweisem Milchzusatz zu einer bestimmten Serumquantität können wir eine erste Zone unterscheiden, innerhalb welcher das Kasein bis auf minimale Spuren vollständig ausgefällt wird, und eine zweite Zone, innerhalb welcher eine gewisse, mit steigendem Zusatz größer werdende Kaseinmenge in Lösung bleibt.

3) Innerhalb dieser Zone der partiellen Fällung ist in den vom Niederschlage befreiten Flüssigkeiten kein oder nur spurenweise freies Präzipitin nachzuweisen.

4) Mit der zugesetzten Milchmenge wächst nicht nur der absolute Wert der in Lösung bleibenden Kaseinmenge, sondern auch deren relative Größe, so daß also hierbei die Fällung immer unvollständiger wird, bis endlich eine Grenze erreicht wird, von welcher ab überhaupt keine merkliche Abscheidung des Kaseins mehr eintritt.

5) Das bei der partiellen Fällung sich abscheidende Kasein absorbiert nicht mehr Präzipitin, als zu seiner Fällung erforderlich ist.

6) Da der hierbei in Lösung bleibende Rest des Präzipitins, wie gesagt, nicht im freien Zustande nachweisbar ist, so muß man annehmen, daß er mit dem zurückbleibenden Kasein eine lösliche Verbindung eingegangen ist.

7) Mit zunehmendem Milchzusatz wächst auch die Menge des in Lösung bleibenden Präzipitins.

Aus alledem ergibt sich, daß sich die quantitativen Verhältnisse der Laktoserumfällung zwar im allgemeinen den für die anderen Präzipitine ermittelten Gesetzen anschließen, daß aber andererseits doch gewisse, durch den besonderen Charakter der fällbaren Komponente, des Kaseins, bedingte Differenzen bestehen. Jedenfalls haben sich aber auch bei diesen Untersuchungen keinerlei Tatsachen ergeben, die mit der Annahme einer chemischen Bindung zwischen Kasein und Präzipitin unvereinbar wären, so daß wir uns also in dieser Beziehung vollkommen der Ansicht von Eisenberg und Volk, bzw. Eisenberg anschließen können. Auch Joos ist übrigens bei seinen Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination zu einer analogen Auffassung gelangt.

Nachdruck verboten.

Weitere Beiträge zur Theorie der bakteriolytischen Immunität

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Königsberg i. Pr.]

Von **B. Pfeiffer** und **E. Friedberger**.

I. Zur Frage der Bildung von Immunkörpern gegen bakteriolytische Ambozeptoren.

In einer früheren Arbeit „Ueber Antikörper gegen die bakteriolytischen Immunkörper der Cholera“ hatten wir gezeigt, daß das Serum von Kaninchen, die mit Ziegencholeraimmunserum vorbehandelt wurden, die Eigenschaft erworben hatte, die bakteriolytische Wirkung der Ziegencholeraambozeptoren im Meerschweinchenperitoneum zu hemmen resp. völlig aufzuheben.

Wir fanden, daß genaue quantitative Beziehungen bestehen zwischen der Menge des Immunserums und der paralysierenden Dosis des Antiimmunserums, ferner daß diese Wirkung des Antiserums eine spezifische war, indem sie nur gegen die von der Ziege stammenden Choleraambozeptoren sich geltend machte, gleichgültig, ob das Serum normaler oder aber das mit Cholera Bakterien immunisierter Ziegen benutzt wurde, während das Serum choleraimmunisierter Kaninchen durch das Antiserum nicht beeinflusst wurde.

Wir zogen aus den von uns beobachteten Tatsachen den Schluß, daß es sich hier nicht um die Wirkung von Antikomplementen, sondern um echte Antiambozeptoren handeln müsse, obwohl theoretisch die Existenz der letzteren Art von Körpern nur schwer verständlich erschien, da, wie Ehrlich mit Recht hervorhebt, man kaum erwarten konnte, entsprechende Gegengruppen, die den Rezeptoren der Bakterien analog sein müßten, in den Zellen höherer Tiere anzutreffen.

Diese theoretischen Schwierigkeiten haben uns veranlaßt, die Frage der Antiimmkörperbildung gegen bakteriolytische Ambozeptoren einer erneuten Prüfung zu unterziehen, zumal inzwischen Tatsachen bekannt geworden sind, welche einer eingehenden Berücksichtigung bedurften.

Hier ist zunächst an die Möglichkeit eines Abbaues der Choleraambozeptoren der Ziege im Organismus des Kaninchens in dem Sinne zu denken, daß zwar die cytophile Gruppe erhalten bleibt, die komplementophilen Gruppen aber verloren gehen. Ein derartig veränderter Ambozeptor würde die Rezeptoren des Cholera vibrio verstopfen können und dadurch die hemmende Wirkung des Antiimmunserums erklären, vorausgesetzt, daß die Avidität dieser Ambozeptoroide zum mindesten gleich ist derjenigen normaler Ambozeptoren.

An sich ist diese Auffassung von vornherein recht unwahrscheinlich mit Rücksicht auf die enorme Zahl von Rezeptoren, die wir an Cholera Bakterien nachweisen konnten, und in Anbetracht der Tatsache, daß die Besetzung von einer sehr geringen Zahl derselben mit intakten Ambozeptoren ausreichend ist, um bei Gegenwart passenden Komplementes die Bakteriolyse herbeizuführen. Ferner würden die quantitativen Verhältnisse bei unserer Versuchsanordnung von diesem Standpunkt aus kaum verständlich erscheinen.

Da nämlich in unseren Versuchen die Bakteriendosis stets die gleiche war (eine Normalöse), so mußte ein Serum, welches durch seinen

Ambozeptoroidgehalt die Bakteriolyse infolge von Verstopfung der Rezeptoren des Bakteriums hinderte, diese Wirksamkeit entfalten, jeder beliebigen Dosis des Choleraimmunserums gegenüber, während unser Antiimmunserum in seiner hemmenden Dosis genau parallel ging der Quantität des Choleraimmunserums. Auch wäre die spezifische Wirkung unseres Antiserums gegenüber den Ziegencholeraambozeptoren bei der Ambozeptoroidhypothese nur in dem Falle verständlich, wenn wir bei den Cholera vibrionen Rezeptoren annehmen, welche spezifisch gegen die aus den verschiedenen Tierspecies stammenden Choleraambozeptoren abgestimmt sind, mit anderen Worten: Der Cholera vibrio müsste einen ungeheuer reichhaltigen Rezeptorenapparat besitzen, von denen einzelne Gruppen z. B. nur für Ziegen, andere für Kaninchen, wieder andere nur für Meerschweinchen u. s. w. bestimmt wären. Wir werden weiterhin Versuche anführen, welche gegen die hier supponierte, das Vorstellungsvermögen überschreitende Kompliziertheit des Bakterienbaues sprechen.

Bedeutungsvoll für die uns beschäftigende Frage war ferner eine Arbeit von Morgenroth und Sachs „Ueber die quantitativen Beziehungen von Ambozeptor, Komplement und Antikomplement“ (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 35).

Hier wurden von den Autoren Beispiele angeführt, in welchen der Antikomplementbedarf keine einfache Funktion der Komplementmenge darstellte, sondern von der vorhandenen Menge des Ambozeptoren abhängig war, also ähnliche Verhältnisse, wie in unseren eigenen Versuchen zur Beobachtung kamen.

Wir wollen auf eine nähere Diskussion dieser theoretisch hochinteressanten und sehr schwierigen Fragen hier nicht näher eingehen, zumal wir unsere Auffassung der Existenz bakteriolytischer Antiambozeptoren durch die nun im folgenden wiederzugebenden Versuche wesentlich stützen können.

Wir legten uns nämlich die Frage vor, ob im Experiment eine Differenz hervortreten würde, 1) wenn das Antiimmunserum zuerst mit den Choleraambozeptoren und dann erst mit Cholera bakterien versetzt würden oder 2) wenn das Antiimmunserum mit Choleraambozeptoren in Beziehungen gebracht würde, welche bereits vorher an die Rezeptoren der Bakterien herangetreten waren.

Im ersten Falle mußte die Hemmung der Bakteriolyse eintreten, da ja die Bedingungen für eine Vereinigung des Antiambozeptors an den Ambozeptor besonders günstig lagen, gleichgültig, ob durch diese Verbindung die cytophile oder die komplementophile Gruppe des Ambozeptors verstopft war.

Im zweiten Falle waren a priori zwei Möglichkeiten vorhanden.

A. Der Antiimmunkörper steht im Aviditätsverhältnis zur cytophilen Gruppe des Ambozeptors, dann mußte, da der Ambozeptor schon an die Rezeptoren des Bakteriums gebunden war, das Antiimmunserum außer stande sein, seine hemmende Wirkung zu entfalten, oder

B. der Antiambozeptor hat als Angriffspunkt die komplementophile Gruppe des Ambozeptors; dann war trotz der vorherigen Bindung von Cholera vibrio und Ambozeptor eine Hemmung der Bakteriolyse zu erwarten.

Die Versuche zur Entscheidung dieser Frage wurden in folgender Weise angestellt:

Verwendet wurde als Antiimmunserum das Serum von Kaninchen, die mit Cholera ziegenimmunserum vorbehandelt waren. Die Wirksam-

keit dieses Serums entsprach fast genau den Werten, welche wir in unserer ersten Arbeit (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 1) für das damals verwendete Antiserum angegeben haben.

Das Cholerazienserum hatte einen Titer von $\frac{1}{15}$ mg, die Cholerakultur die Virulenz von $\frac{1}{10}$ Normalöse.

Wir wollen eine der Versuchsreihen ausführlich schildern.

Versuch A.

0,50 mg Cholerazienserum (= 7,5 I.E.), werden mit einer Oese Cholera in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung gemischt und 40 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten. Nunmehr wird 0,02 des Antiserums zugesetzt und die Mischung einem Meerschweinchen von 245 g intraperitoneal injiziert. Sofort nach der Injektion massenhaft Vibrionen. Aber schon nach 1 Stunde sind nur noch Körnchen zu finden. Das Tier bleibt am Leben.

Versuch B.

Im entsprechenden Parallelversuch wird die gleiche Dosis [0,5 mg Cholerazienserum (= 7,5 I.E.)] mit 0,02 Antiserum und 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung gemischt und 40 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten. Jetzt wird 1 Oese Cholera hinzugefügt und diese Mischung einem Meerschweinchen von 250 g Gewicht intraperitoneal injiziert.

Verlauf der Infektion.

Sofort nach der Injektion: sehr viel Vibrionen;
nach 35 Minuten: massenhaft Vibrionen neben reichlichen Körnchen;
nach 4 Stunden: massenhaft Vibrionen, keine Granula;
folgender Tag: Tier tot mit typhischem Choleraabefund.

Wir sehen also, daß in der Tat die Wirkung der drei Komponenten Cholera vibrio, Antikörper und Ambozeptor ganz auffällige Differenzen zeigt je nachdem man erst den Vibrio mit dem Ambozeptor zusammenbringt oder vorher den Ambozeptor mit dem Antiserum mischt.

Die Versuche verliefen demnach genau so, wie wir es erwarten durften, wenn in dem Antiserum ein Antiambozeptor mit Affinität für die cytophile Gruppe des Ambozeptors vorhanden wäre. Die Antikomplementhypothese würde unserer Auffassung nach hier ganz im Stich lassen.

Derartig glatte und beweisende Versuchsergebnisse, wie sie eben geschildert wurden, sind allerdings nur dann zu beobachten, wenn ein ganz bestimmtes, für jeden Fall auszuprobierendes Verhältnis von Immunserum und Antiserum getroffen wird.

Wird die Quantität des Antiserums vergrößert resp. die Menge des Choleraimmunserums verringert, so tritt die Hemmung der Bakteriolyse wieder hervor, so daß die Tiere sterben.

Ein derartiger Versuch folgt nunmehr.

Versuch C.

$\frac{1}{5}$ mg Cholerazienserum (= 2 I.E.) wird mit 1 Oese Cholera gemischt, 40 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten, dann nach Zusatz von 0,02 Antiserum einem Meerschweinchen von 210 g Gewicht intraperitoneal injiziert.

Verlauf der Injektion.;

Sofort nach der Injektion: sehr viel Vibrionen;
nach 45 Minuten: massenhaft Körnchen, spärlich Vibrionen;
nach 2 Stunden: Zunahme der Bakterien;
folgender Tag: Tier tot.

In allen solchen Fällen, auch wenn die Tiere schließlich sterben, beobachteten wir eine deutliche Differenz in der Schnelligkeit und dem Umfang der Vibrionenzerstörung, je nach den Versuchsbedingungen und zwar stets in dem Sinne, daß die Bildung der Granula im Meerschweinchenperitoneum bei vorheriger Bindung des Ambozeptors an dem

Vibrio sehr viel intensiver in Erscheinung trat, als wenn umgekehrt Ambozeptor und Antiserum zuerst in Beziehung treten konnten.

Die Tatsache, daß bei einem relativen Ueberwiegen des Antimmunserums der Tod der Tiere durch Hemmung der Bakteriolyse, auch wenn die Ambozeptoren am Vibrio schon vorher verankert waren, eintrat, erklären wir uns durch eine Art Massenwirkung der Antiambozeptoren, wobei die Bindung Rezeptor-Ambozeptor gesprengt wird zu Gunsten der Verbindung Ambozeptor-Antiambozeptor.

Weitere Versuche belehrten uns, daß die Cholera-vibrionen zu den wirksamen Bestandteilen des Antiserums keine direkte Affinität besitzen.

Wir wiesen dies dadurch nach, daß wir im Verhältnis 1:20 verdünntes Antimmunserum mit Cholera-bakterien zusammenbrachten und zwar pro Kubikcentimeter mit einer Normalöse Bakterien.

Nach 20 Minuten langem Stehen bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert und dann die von Bakterien befreite Flüssigkeit auf ihren Gehalt an Antiambozeptoren geprüft.

Es ergab sich hierbei keine Verringerung der die Bakteriolyse hemmenden Wirkung.

Zur Kontrolle wurden die abzentrifugierten Bakterien dann mehrmals mit stets erneuten Mengen physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Von dem Bodensatz wurde eine Menge, die etwa $1\frac{1}{2}$ Oesen entsprach, in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und nach Zusatz von nur $\frac{1}{10}$ mg Cholera-ziegen Serum (= 1,5 I.E.) einem Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Es trat prompte Auflösung der Vibrionen ein; das Tier blieb am Leben, während das Kontrolltier, welches dieselbe Menge des Bodensatzes ohne Zusatz von Cholera-ziegen Serum erhalten hatte, typisch an Cholera-peritonitis zu Grunde ging.

Ferner untersuchten wir, wie sich das Antiserum beim Erhitzen verhalten würde.

Ein Antiserum, welches in der Dosis von 0,03 die Wirkung von 15 I.E. der Cholera-ziegenambozeptoren aufhob, wurde $1\frac{1}{2}$ Stunden in einen auf 60° eingestellten Thermostaten gebracht; danach zeigte sich eine deutliche Verminderung der hemmenden Wirkung, indem 0,03 des auf 60° erhitzten Antiserums nicht mehr die bakteriolytische Wirkung von 15, sondern nur noch von 8 I.E. Ziegencholeraambozeptoren paralyisierte.

Es geht aus diesem Versuch hervor, daß die wirksamen Substanzen des Choleraantiambozeptorenserums relativ stabile Gruppen sein müssen und sich der Hitze einwirkung gegenüber analog den Serums-substanzen vom Ambozeptorentypus verhalten.

Unsere früheren Arbeiten hatten uns zu der Vorstellung geführt, daß die im normalen Ziegen Serum vorhandenen Choleraambozeptoren mit denen bei der Immunisierung sich anhäufenden, mit höchster Wahrscheinlichkeit als identisch aufzufassen sind. Hiernach durften wir erwarten, daß es uns gelingen würde, auch durch Verimpfung normalen Serums die Bildung von Antiambozeptoren anzuregen.

In der Tat hat diese Voraussetzung durch das Experiment ihre Bestätigung gefunden.

Wir behandelten Kaninchen in genau derselben Weise, wie wir dies mit Ziegencholeraimmunserum getan hatten, mit normalem Ziegen Serum, welches eine so stark schützende Wirkung zeigte, daß schon 5 mg da-

von im Meerschweinchenperitoneum eine Oese Cholera zur Auflösung brachte.

Von diesen Kaninchen erhielten wir ein Serum, welches eine deutlich hemmende Wirkung entfaltete, und zwar so, daß 0,1 Antiambozeptorenserum bis zu 5 I.E. von Choleraziiegenimmunserum komplett paralyisierte. Dieses mit **normalem** Ziegen Serum erhaltene Antiummunserum war demnach mindestens 10mal schwächer als die durch Vorbehandlung mit Choleraziiegenimmunserum früher erhaltenen.

Auch dieses Resultat steht in voller Uebereinstimmung mit unserer Auffassung, wonach es sich bei unseren Versuchen um das Auftreten von Antiambozeptoren, nicht aber um das von Antikomplement handelt, da der Komplementgehalt des Normalserums sich nicht unterscheidet von dem des Immunserums, wohl aber die Quantität der darin enthaltenen Ambozeptoren.

Wäre der Komplementgehalt des zur Vorbehandlung benutzten Serums das Entscheidende, so müßten, gleichgültig ob Normal- oder Immunserum zur Vorbehandlung diene, die entstehenden Antisera annähernd gleichwertig gewesen sein.

Die beobachtete tatsächliche Differenz ist unter diesen Umständen ein wichtiges Argument für die Existenz von Antiambozeptoren.

Es muß hier erwähnt werden, daß es nicht unter allen Umständen und bei allen Tierspecies gelingt, Antiimmunkörper gleich leicht und sicher in nachweisbaren Mengen zu erzeugen. Eine Taube z. B., die 5 ccm Ziegencholeraimmunserum (Tit. $\frac{1}{8}$ mg) in den Brustmuskel injiziert erhalten hatte, lieferte ein Serum, von dem selbst 0,1 3 Immunitätseinheiten von Ziegencholeraserum nicht tangierte.

Auch die Vorbehandlung eines Foxterriers mit sehr wirksamem Kaninchencholeraimmunserum (Tit. $\frac{1}{1,5}$ mg) lieferte kein deutlich hemmendes Serum, da 0,05 Serum des vorbehandelten Hundes nicht einmal 1,5 I.E. Choleraziiegen Serum paralyisierte.

Wir wollen hier hervorheben, daß es uns auch mit Typhusimmunserum gelungen ist, entsprechende Antiimmunsera zu erzeugen.

Wir behandelten 2 Kaninchen genau in derselben Weise in 8-tägigen Intervallen mit 3 Injektionen von je 10 ccm Typhushundeimmunserum (Titer 1 mg).

Nur bei dem Serum des einen Kaninchens zeigte sich eine deutliche, wenn auch schwache, Wirksamkeit, indem 0,1 des Antiimmunserums 2 I.E. des Immunserums in ihrer Wirkung aufhob.

Die Resultate einer Reihe derartiger Versuche sind ersichtlich aus der nebenstehenden tabellarischen Zusammenstellung.

Es ist nun die Frage zu erörtern, wie wir uns die Konstitution dieser Antiambozeptoren zu denken haben.

Die nächstliegende Vorstellung ist die, daß sie den Rezeptoren der Bakterien, mit welchen die cytophile Gruppe der Ambozeptoren sich verbindet, entsprechen. Man würde dann gewissermaßen freie Rezeptoren des Kochschen Vibrio im Serum der mit Ambozeptoren immunisierten Tiere zu erwarten haben; bei dieser Voraussetzung müßte die Möglichkeit bestehen, mit derartigen Antiimmunseris ebenso wie mit der Bakteriensubstanz selbst eine aktive Immunisierung zu erzeugen.

Diese Vorstellung ist von vornherein sehr unwahrscheinlich. Trotzdem haben wir sie durch ein Experiment zu prüfen gesucht, indem wir eine kleine junge Ziege mit erheblichen Quantitäten des Serums von Kaninchen vorbehandelten, welchen wir zur Erzeugung von Antiimmunkörpern vorher Ziegencholeraimmunserum injiziert hatten.

Tabelle.

Gewicht des Meerschweinchens in Gramm	Infektionsdosis von Typhus. Virulenz $\frac{1}{10}$ Oese	Dosis des Typhusimmunsersums vom Hund	Dosis des Antisummersums vom Kaninchen	Resultat
320	1 Oese	5 mg	0,1	lebt
290	1 "	3 "	0,1	lebt
290	1 "	2 "	0,1	tot
				Prozeß abgelaufen. (Grenze der Wirkung.)
250	1 "	3 "	0,2	tot mit typischem Typhusbefund
310	1 "	2 "	0,2	do.
250	1 "	3 "	0,3	do.
240	1 "	1,5 "	0,3 Normalserum des Kaninchens vor der Behandlung entnommen.	lebt. Kontrolle.

Das Serum dieser Ziege wurde vor und nach dem Versuche titriert. Das Resultat war ein vollständig negatives, indem der Titer des Serums dieser Ziege gegenüber Cholera vibriionen sich völlig unverändert zeigte, eine aktive Immunisierung also nicht nachweisbar war. Da in diesem Fall das uns für die Vorbehandlung zur Verfügung stehende Antiserum leider relativ geringwertig war, so halten wir diese Frage noch nicht für definitiv abgeschlossen. Wir sind mit weiteren Versuchen nach dieser Richtung hin zur Zeit beschäftigt.

Aus theoretischen Gründen sind wir aber zu einer anderen Auffassung über die Natur der Antiambozeptoren geneigt. Es müssen die Antiambozeptoren Zellbestandteile sein, welche eine haptophore Gruppe von analogem Bau, wie die Bakterienrezeptoren haben, die im übrigen aber von diesen different sein können.

Bei der genauen Verfolgung der immunisierenden Kraft des Serums von Mensch und Tier, welche eine aktive oder passive Immunität gegen Cholera erworben haben, sehen wir, daß die im Serum in einem gegebenen Moment so reichlich vorhandenen Choleraambozeptoren mehr oder weniger schnell wieder verschwinden, besonders rasch ist dies der Fall nach der Einverleibung von heterologem Immuns Serum.

Wo bleiben diese Ambozeptoren des Serums? Unter den normalen Sekreten finden wir nur in der Milch eine erhebliche Ausscheidung von Immunsstoffen. Da aber auch bei den nicht milchenden Tieren die Immunkörper ebenso rasch verschwinden, so müssen wir uns nach anderen Möglichkeiten umsehen, und da liegt der Gedanke nahe, daß sie einfach an die Zellen zurückkehren, von denen sie sezerniert sind. Diejenigen Gruppen, an welche die Ambozeptoren des Serums sich wieder anheften, könnten unter bestimmten, nicht stets realisierten Verhältnissen gewissermaßen hypertrophieren und ihrerseits als Antiambozeptoren in die Blutbahn übergehen. Ihr freies Auftreten im Serum würde dadurch als ein Specialfall zu betrachten sein.

Wenn infolgedessen andere Autoren auf Antiimmunwirkung des Serums nicht gestoßen sind, bei Tieren, welche beispielsweise mit Tetanus oder Diphtherietoxin vorbehandelt waren, so erscheint dies nun nicht

allzu wunderbar. Vielleicht könnte man aber auf indirektem Wege dieser Frage näher kommen.

Man müßte Tiere z. B. mit Diphtherieantitoxin vorbehandeln und von Tag zu Tag den Grad der noch vorhandenen passiven Immunität quantitativ verfolgen. Würde sich herausstellen, daß bei späteren, wiederholten Injektionen von Antitoxin das Verschwinden der Antikörper rascher und vollständiger sich vollzieht, wie bei der ersten Injektion, so würde diese Tatsache in unserem Sinne zu deuten sein.

Man sieht andererseits, welch große praktische Konsequenz der Lösung dieser Frage für den Gebrauch antitoxischer und bakteriolytischer Sera zu Immunisierungszwecken beizumessen ist. Es ist nämlich die Möglichkeit ins Auge zu fassen ist, daß durch voraufgehende passive Immunisierung der Organismus so verändert werden kann, daß er später außer stande ist, im Ernstfalle sich der gleichen Antikörper, z. B. der Diphtherieantitoxine des Pferdeserums, zur Neutralisierung des Toxins oder zur Vernichtung der Krankheitserreger zu bedienen.

II. Ueber den Rezeptorenapparat des Cholera vibrio.

Wir hatten früher (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 25) nachgewiesen, daß die Bindungsfähigkeit der Cholera vibrien für die Immunkörper des Choleraserums in weiten Grenzen schwankt und daß sie, so weit wir aus unseren bisherigen Versuchen urteilen können, mit der Virulenz der Bakterien in Beziehung steht in dem Sinne, daß mit Erhöhung der Virulenz auch die Affinität der Vibrionenrezeptoren für die Choleraambozeptoren sich steigert.

Damit im Zusammenhang stehend erschien uns die Tatsache, daß auch die immunisierende Wirkung der Cholera bakterien der Virulenz parallel ging. Wir mußten aus diesen Beobachtungen den Schluß ziehen, daß die Zahl der am Vibrio vorhandenen Rezeptoren eine sehr große sei, während die Besetzung eines kleinen Bruchteiles derselben mit Ambozeptor und Komplement schon genügt, um die Auflösung herbeizuführen.

Wir zeigten ferner, daß bei reichlichem Ueberschuß von Ambozeptoren die immunisierende Wirkung der so mit Choleraambozeptoren vollständig beladenen Cholera vibrien erheblich geschwächt oder sogar völlig ausgeschaltet war.

Man konnte sich nun fragen, ob die Komplexität der Verhältnisse noch weiter geht und ob die Rezeptoren des Cholera bakteriums, welche mit den Choleraambozeptoren der verschiedenen Tierspecies sich verbinden, unter sich wieder different sind.

Die Beantwortung dieser Frage geht eigentlich schon aus unseren früheren Arbeiten hervor. War die letzterwähnte Annahme richtig, so mußten zur Aufhebung der immunisierenden Wirkung ausschließlich Isoambozeptoren befähigt sein, während die Cholera vibrien nach Beladung mit Heteroambozeptoren ihre immunisierende Wirkung behalten sollten. Nun haben wir schon Beobachtungen publiziert (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 25. S.-A. p. 12. Tab. IV), wonach der immunisierende Effekt der Cholera vibrien für Kaninchen nicht allein durch Kaninchenimmenserum, sondern auch durch Ziegenimmenserum in fast der gleichen Weise ausgeschaltet wird. Wir haben diese Experimente nochmals wiederholt unter Versuchsbedingungen, die uns besonders beweisend erscheinen. Wir injizierten je 2 Oesen Cholera vibrien in das Meer-schweinchenperitoneum, im Versuch A mit 2500, im Versuch B mit 25 000 IE. (entsprechend 0,1 resp. 1,0 Ziegencholeraserum vom Titer $\frac{1}{25}$ mg).

Nach etwa 40 Minuten, als die Zerstörung der Vibrionen schon fast vollständig war, wurden die beiden Meerschweinchen getötet, ihr Peritoneum mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und dann die Waschlösungen, wie in den früheren Versuchen (Pfeiffer, Deutsche med. Wochenschr. 1901. No. 50/51. S.-A. p. 5), durch Berkefeld-Liliputkerzen filtriert. Die vollkommen klaren, kulturell auf Sterilität geprüften Filtrate wurden Kaninchen in die Ohrvene injiziert.

Das nach 8 Tagen abgenommene Serum dieser Kaninchen zeigte in Versuch A (2500 IE.) einen Titer von 9 mg und in Versuch B (25 000 IE.) den noch geringeren Titer zwischen 0,05 und 0,01, wobei möglicherweise ein Teil des Wertes durch noch im Blute zirkulierende Reste der enorm hohen Menge von passiv übertragenen Ziegencholeraambozeptoren bedingt war.

Vergleichen wir diese Versuchsergebnisse mit den früheren bei der gleichen Versuchsanordnung nach Absättigung mit einem Ueberschuß von Kaninchencholeraambozeptoren erhaltenen Titerwerten (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 25. S.-A. p. 11. Tab. IV), so finden wir eine sehr befriedigende Uebereinstimmung.

Es ist demnach wohl kaum mehr daran zu zweifeln, daß Kaninchencholeraambozeptoren und Ziegencholeraambozeptoren an denselben Rezeptoren des Kochschen Vibrio angreifen und sich deshalb auch gegenseitig vertreten können.

III. Ueber die Art der Bindung der Choleraambozeptoren an die Cholera Bakterien und ihr Verhalten bei der Bakteriolyse.

Wir wissen, wie auch in dieser Arbeit schon mehrfach betont ist, daß die Cholera Bakterien abhängig von ihrer Virulenz ein sehr großes Multiplum derjenigen Ambozeptorenmenge, welche zu ihrer Auflösung notwendig ist, an sich binden können. Die Bakterien sind ihrerseits lebende Gebilde und man konnte daher sich fragen: Was wird aus den an die Bakterien gebundenen Choleraambozeptoren beim weiteren Lebensprozeß der Bakterien?

Der Gedanke war von vornherein nicht von der Hand zu weisen, daß die lebenden Bakterien eine zerstörende Wirkung auf die an sie geketteten Ambozeptoren ausüben vermöchten und es würde eine derartige Konstatierung mit unseren bisherigen Vorstellungen über das Wesen der Virulenz gut verträglich gewesen sein.

Zur Prüfung dieser Frage besäßen wir eine Mischung von 0,1 Ziegencholeraserum = 2500 IE. in 5 ccm Bouillon mit virulenter Cholera, brachten diese Mischung, um eine möglichste Entwicklung der Cholera Bakterien herbeizuführen, 2 Tage in den Brutschrank bei 37° und bewahrten sie dann bei Zimmertemperatur weitere 4 Wochen auf. Die resultierende Kulturflüssigkeit prüften wir nach dieser Zeit auf die Zahl der darin noch vorhandenen Immunitätseinheiten, indem wir die getrübe Bouillon mit dem darin befindlichen Bodensatze durch langdauerndes Schütteln mit einer abgemessenen Menge physiologischer Kochsalzlösung möglichst gleichmäßig emulsierten und von der Emulsion in der gewöhnlichen Weise weitere Verdünnungen anlegten. Eine Verdünnung, welche einem Gehalt von 2,5 IE. entsprach, hatte im Meerschweinchenversuch noch prompte bakterienauflösende Wirkung.

Leider wurde bei diesem Versuche die untere Grenze der Wirksamkeit nicht ermittelt.

Immerhin ist zu folgern, daß selbst nach 32-tägigem

üppigem Wachstum der Choleraabakterien in verdünntem Immunserum noch mindestens die Hälfte der ursprünglich der Bouillon zugesetzten Choleraambozeptoren vorhanden war.

In einem zweiten Versuche wurde 0,1 Choleraziegenserum (Titer $\frac{1}{15}$ mg = 1500 IE.) mit 5 ccm Bouillon versetzt und mit virulenter Cholera infiziert. Das Röhrchen wurde 2 Tage im Brütschranke bei 37° und dann weitere 16 Tage bei Zimmertemperatur, vor Licht geschützt, aufbewahrt. Es wurde dann die durch Choleraabakterien stark getrübbte Flüssigkeit durch kräftiges Schütteln sorgfältig emulsioniert und 1500-fach verdünnt, so daß jeder Kubikcentimeter nur noch 1 IE. enthielt.

In 1 ccm = IE. wurde dann 1 Oese normal virulenter frischer Cholera aufgeschwemmt und einem Meerschweinchen von 210 g in die Bauchhöhle gespritzt.

Das Tier bleibt unter normalem Ablaufe der Vibrionenzerstörung am Leben. Ein zweites Tier mit 1,5 IE. (= 115 ccm der Verdünnung), in gleicher Weise behandelt, verhält sich ebenso. Damit ist bewiesen, daß nach 18-tägigem Wachstum der Choleraabakterien in verdünntem Choleraimmunserum die ursprünglich eingebrachte Menge von Immunitätseinheiten noch quantitativ nachweisbar war.

Hier konnte man immerhin den Einwand erheben, daß ein etwaiger, wenn auch geringer, Verlust durch die unvermeidlichen, auf einige Prozent zu schätzenden Versuchsfehler verdeckt sein konnte. So hätten von den eingebrachten ursprünglichen 1500 IE. beispielsweise 50 bis 100 IE. verschwinden können, ohne daß dies in den Versuchen zu Tage getreten wäre. Deshalb wurde auch folgendes Experiment angestellt:

7,5 IE. wurden zu 5 ccm Bouillon aufgefüllt, mit lebender virulenter Cholera infiziert und 2 Tage in den Brütschrank gestellt. Von dieser üppig gewachsenen Choleraabouillon vermochte 1 ccm = 1,5 IE. eine volle Oese neu zugesetzter frischer virulenter Choleraabkultur prompt zur Auflösung zu bringen. Es waren also noch mindestens 5 IE. vorhanden, wahrscheinlich aber, wie aus dem schnellen Verlaufe des Auflösungsprozesses geschlossen werden darf, noch die Gesamtmenge von 7,5 IE.

Wir kommen somit zu dem nunmehr unabweislichen Schlusse, daß die Choleraabvibrionen außerstande sind, bei ihrem Lebensprozesse Choleraimmunkörper zu zerstören.

Dieses Resultat diene uns als Ausgangspunkt für die Prüfung einer anderen wichtigen Frage, wie sich nämlich die an die Choleraabvibrionen gebundenen Choleraambozeptoren verhalten, wenn in der Bauchhöhle des Meerschweinchen die Bakteriolyse eintritt.

Zunächst versetzten wir Verdünnungen 1 : 100 des Ziegencholeraserums vom Titer $\frac{1}{25}$ mg mit solchen Mengen frischer virulenter Cholera, daß pro Kubikcentimeter eine Normalöse emulsioniert war. 2 ccm dieser Emulsion, enthaltend 500 I.E., und 2 Oesen Cholera kamen $\frac{1}{2}$ Stunde in den Brütschrank bei 37°. Es wurde danach zentrifugiert, die zurückbleibenden gut agglutinierten Bakterien wurden dann 5mal mit je 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, indem immer wieder von neuem zentrifugiert und das überstehende Waschwasser abgegossen wurde zur Entfernung jeden Restes ungebundener Ambozeptoren. Der so gründlich gewaschene Rückstand wurde in einem gemessenen Volumen Kochsalzlösung aufgeschüttelt und möglichst gleichmäßig wieder emulsioniert. Von dieser Stammemulsion wurden dann weitere Verdünnungen angelegt zur Ermittlung derjenigen Dosis, welche

noch gerade eine Oese frisch zugesetzter virulenter Cholera im Meerschweinchenperitoneum zur Auflösung zu bringen vermochte.

So wurde festgestellt, daß in der kleinen Menge von Cholera Bakterien, welche infolge der bei den verschiedenen Manipulationen unvermeidlichen Verluste nur als ein nicht unerheblich veringertes Bruchteil der ursprünglich eingesäten 2 Oesen veranzuschlagen war, 150 I.E., kondensiert waren, d. h. die Bakterien, welche die Träger dieser Immunitätseinheiten waren, wurden nicht allein selbst aufgelöst, sondern setzten bei ihrer Destruktion im Peritoneum des Meerschweinchens noch so viel gebundene Ambozeptoren in Freiheit, daß sie für die Bakteriolyse von 150 Oesen virulenter Cholera ausgereicht hätten.

Eine Wiederholung des Versuches ergab völlig identische Resultate.

Immerhin war bei den eben dargelegten Experimenten nur etwa $\frac{1}{3}$ der ursprünglich vorhandenen Ambozeptoren wiedergefunden worden, während der Rest in dem Waschwasser vermutet werden konnte. Andererseits war doch die Möglichkeit vorhanden, daß ein gewisser Bruchteil der Ambozeptoren deshalb nicht ermittelt werden konnte, weil er zwar gebunden, aber nachträglich bei der Bakteriolyse der damit beladenen Vibriolen verbraucht worden war.

Dieser Erwägung nachgehend, stellten wir den folgenden Versuch an:

Wir bereiteten eine Verdünnung desselben Cholera ziegenserums (Titer $\frac{1}{25}$ mg) im Verhältnis 1 : 1000, so daß pro Kubikcentimeter 25 I.E. vorhanden waren. 2 ccm dieser letzteren Verdünnung versetzten wir mit 2 Oesen Cholera und ließen diese Mischung 25 Minuten bei 37°. Jetzt wurde wieder gut geschüttelt und nun durch Titrierung die Menge der in toto noch nachweisbaren Choleraambozeptoren festgestellt, wobei ganz davon abgesehen wurde, was gebunden, was noch frei davon war. Es ergab sich, daß 0,04 der Emulsion gerade noch 1 Oese neu zugesetzter virulenter Cholera im Meerschweinchenperitoneum bakteriolyse, d. h. es war jetzt die Gesamtmenge der ursprünglich eingebrachten Ambozeptoren noch nachweisbar, eine Zerstörung von Ambozeptoren bei der Auflösung der mit ihnen verbundenen Cholera Bakterien war in diesem Versuche nicht festzustellen, wobei zu berücksichtigen ist, daß Verluste von wenigen Prozenten der Ambozeptoren durch die Fehlerquellen verdeckt werden konnten.

Wir müssen daraus schließen, daß zum mindesten die über eine Immunitätseinheit hinausgehende Menge von Antikörpern, auch wenn sie vor der Bakteriolyse an die Bakterienrezeptoren verankert war, bei der durch das Komplement verursachten vollständigen Auflösung wieder frei und aktionsfähig wird¹⁾.

Eine gute Bestätigung dieser Auffassung geben auch die folgenden Versuche, die wir der Wichtigkeit dieser Frage entsprechend in extenso reproduzieren.

1) Diese von uns festgestellte Tatsache scheint zunächst in Widerspruch zu stehen mit der Arbeit Morgenroths, Ueber die Bindung hämolytischer Ambozeptoren. (Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 2), wonach die Fähigkeit hämolytischer Ambozeptoren, von dem Rezeptor eines Blutkörperchens auf den Rezeptor eines anderen Blutkörperchens überspringen, nur so lange besteht, als dieselben nicht auch Komplemente verankert haben.

Versuch A.

$\frac{1}{2}$ Oese Cholera wird mit 1 I.E. Cholerazienserum gemischt und 10 Minuten im Eisschranke gehalten, um einerseits eine Vermehrung der Vibrionen möglichst zu verhindern, andererseits aber doch die Bindung des Ambozeptors an den Vibrio zu ermöglichen. Dieses Gemisch wurde danach in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung einem Meerschweinchen von 230 g intraperitoneal injiziert. Nach 20 Minuten wurde $\frac{1}{2}$ Oese Cholera, in 0,4 ccm physiologischer Kochsalzlösung emulsiert, nachgespritzt und durch Kneten gut in der Bauchhöhle verteilt. Die Bakteriolyse nahm ihren normalen Verlauf; das Tier blieb am Leben.

Versuch B.

1 Oese Cholera wird mit 2,5 IE. gemischt, wieder 10 Minuten im Eisschranke gehalten, dann einem Meerschweinchen von 250 g Gewicht intraperitoneal injiziert; nach 20 Minuten sehr viel Granula, viel weniger gut erhaltene Vibrionen. Jetzt wird eine zweite volle Oese Cholerakultur nachgespritzt. Trotz dieser enormen Choleradosis bleibt das Tier am Leben.

Diese Versuche geben zu folgenden Betrachtungen Veranlassung:

Selbst $\frac{1}{2}$ und sogar eine ganze Oese Cholera verbrauchen, wenn sie 1 resp. $2\frac{1}{2}$ I.E. fixiert haben, zur Bakteriolyse offenbar höchstens nur $\frac{1}{2}$ resp. 1 I.E., so daß die zweite Hälfte der Ambozeptorenmenge wieder disponibel wird, um nochmals die gleiche von neuem zugeführte Menge von Cholerabakterien zu lösen. Man könnte hier auf den Gedanken kommen, ob denn überhaupt beim bakteriolytischen Prozeß Ambozeptoren verbraucht werden oder ob dieselben immer von neuem sich regenerierend wie eine katalytisch wirkende Substanz die Vereinigung von Vibrio und Komplement herbeiführen¹⁾. Ein Versuch diese Hypothese exakt zu prüfen, trifft auf erhebliche Schwierigkeiten, da die Bakterien lebende und sich vermehrende Gebilde sind, die in die Bauchhöhle eingebrachten Ambozeptoren aber im Laufe des über gewisse Zeit sich hinziehenden Auflösungsprozesses durch Resorption zum Teil verschwinden, wofür dann die eigenen normalen Ambozeptoren der betreffenden Tierspecies in gar nicht zu kontrollierenden Mengen mit dem Saftstrom in die Bauchhöhle geführt werden, Bedingungen, durch welche absolut quantitative Messungen, die zur Entscheidung dieser Frage erforderlich sind, sehr erschwert werden. Es ist zu fürchten, daß auch das Studium der Hämolyse, das in den Händen Ehrlichs und seiner Schüler so überraschende Aufschlüsse gegeben hat, bei der Lösung dieses Problems im Stich lassen wird, da eben im Reagenzglas keine echte Hämolyse, sondern nur eine Abtötung der Erythrocyten, die mit einem Austritt des Hämoglobins verbunden ist, in Erscheinung tritt, während das Stroma erhalten bleibt und daher voraussichtlich die an dasselbe einmal verankerten hämolytischen Ambozeptoren nicht mehr frei gibt. Für diese Auffassung spricht auch der bekannte Versuch von Bordet, wonach eine bestimmte Menge hämolytischen Immuserums verschiedene Mengen von Erythrocyten tötet, je nachdem die letzteren auf einmal oder portionsweise zugesetzt werden.

Im letzteren Falle verankert die erste Portion der roten Blutzellen die Gesamtmenge der hämolytischen Ambozeptoren durch Ueberbindung, so daß für die später zugesetzten Erythrocyten nichts mehr übrig bleibt.

1) Die Tatsache, daß zur Auflösung einer Oese Cholera doch immerhin eine Immunitätseinheit notwendig ist, wird allerdings mit dieser von uns nur rein hypothetisch betrachteten Annahme zunächst unvereinbar erscheinen, da auch die kleinsten Mengen immer wieder von neuem sich regenerierender Ambozeptoren schließlich die größten Mengen von Cholerabakterien bakteriolisieren müßten. Dabei aber ist nicht berücksichtigt, daß die Bakterien sich vermehren und daß bei nicht ausreichenden Mengen des Immunkörpers die Wucherung der Vibrionen rascher fortschreiten kann wie ihre Zerstörung.

Der Widerspruch zwischen diesem Versuch Bordets und unseren Resultaten erklärt sich eben dadurch, daß im Reagenzglasversuch überhaupt keine echte Hämolyse eintritt, deshalb die einmal fixierten Ambozeptoren nicht mehr von neuem aktionsfähig werden können. Auch die Angabe von Morgenroth, welche wir oben erwähnt haben, würde von diesem Standpunkte aus verständlich werden.

Trotz der eben dargelegten theoretisch konstruierten Schwierigkeiten ist es uns doch, wie wir glauben, gelungen, die wichtige Frage, ob bei der Bakteriolyse ein Verbrauch von Ambozeptoren eintritt, bis zu einem gewissen Grade zu lösen und zwar durch folgende Versuchsanordnung, die, der Wichtigkeit des Experimentes entsprechend, in extenso mitgeteilt werden soll:

Versuch I.

5 IE. Cholerazienserum werden in 2,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit 5 Oesen virulenter Cholera, welche gleichfalls in 2,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und um die Vermehrung der Vibrionen auszuschalten, bei 60° 2 Stunden lang sicher sterilisiert waren, zusammengebracht, so daß jeder Kubikcentimeter der Mischung 1 IE. und 1 Oese abgetöteter Cholera enthält. Diese Mischung wurde darauf 6 Stunden im Brütschranke bei 37° gehalten und dann austitriert.

Titrierung der Emulsion:

	No. 67, Meerschweinchen 220 g, erhält		
9 Uhr	} 1,2 ccm obiger Emulsion } ² / ₄ Oese Cholera	}	intraperitoneal
10 „ 30 Min.			
1 „	viel Granula; ziemlich spärlich Vibrionen		
3 „	noch wenig Vibrionen; viel Granula		
5 „	vereinzelte Granula		
	Prozeß abgelaufen		
	No. 63, Meerschweinchen 190 g erhält		
6 Uhr 30 Min.	} 1 ccm obiger Emulsion = 1 IE. } ² / ₄ Oese Cholera	}	intraperitoneal
7 „			
9 „	² / ₄ Vibrionen, ¹ / ₄ Granula		
	ziemlich Vibrionen, weniger Granula		

Folgenden Tag: Prozeß abgelaufen; Peritoneum mikroskopisch steril.

Zu diesen Versuchen wurden folgende Kontrollen angestellt:

I. Kontrolle: Um zu entscheiden, ob nicht vielleicht abgetötete Cholera in entsprechender Menge an sich schützt, wurde folgender Versuch gemacht:

	No. 70, Meerschweinchen 190 g, erhält		
12 Uhr 5 Min.	} 1 Oese Cholera 2 Std. bei 60° abgetötet (steril) } ¹ / ₂ „ lebender Cholera	}	intraperitoneal
3 „ 15 „			
4 „ 30 „	ziemlich viel Vibrionen		
	do.		

Folgenden Tag: Tier †, Vibrionen massenhaft in Reinkultur.

II. Kontrolle: Es mußte ferner festgestellt werden, ob die abgetöteten Cholerabakterien tatsächlich die eingebrachten 5 IE. vollständig verankert hatten, oder ob ein Teil derselben frei in der Zwischenflüssigkeit noch nachweisbar war. Es wurde daher die Emulsion scharf zentrifugiert und die absolut klare Flüssigkeit vorsichtig (ohne Bakterien) vom Bodensatz abgossen.

Titrierung der Flüssigkeit:

	No. 65, Meerschweinchen 240 g, erhält		
10 Uhr 30 Min.	} 1,5 ccm Zentrifugat } 1 Oese Cholera	}	intraperitoneal

11 Uhr 30 Min. ziemlich viele Vibrionen; spärliche Granula
 12 „ 20 „ massenhafte Vibrionen; sehr spärliche Granula
 3 „ 1. V †. Vibrionen massenhaft in Reinkultur.

Versuch II.

Für eine weitere Versuchsreihe wurde wiederum eine Emulsion von 5 ccm Flüssigkeit, enthaltend 5 Oesen abgetöteter Cholera und 5 IE. des gleichen Immunserums, hergestellt. Der einzige Unterschied gegen die Versuchsanordnung im vorigen Experimente bestand darin, daß die Emulsion 14 Stunden (statt 6 im vorigen Versuche) im Brütschranke bei 37° gehalten wurde.

Titrierung der Emulsion:

10 Uhr 15 Min.	No. 71, Meerschweinchen 190 g, erhält $\left. \begin{array}{l} 1,2 \text{ ccm obiger Emulsion (= } 1,2 \text{ IE.)} \\ \frac{3}{4} \text{ Oese Cholera} \end{array} \right\}$	intrapertoneal
11 „ 20 „	sehr viele Granula; wenige Vibrionen	
12 „	„ „ „ noch immer spärliche Vibrionen	
3 „	abgelaufen.	
11 Uhr 40 Min.	No. 75, Meerschweinchen 200 g, erhält Injektion wie bei Meerschweinchen No. 71	
12 „ 50 „	$\frac{2}{3}$ Granula, $\frac{1}{3}$ Vibrionen	
3 „	fast abgelaufen (nur spärliche Granula)	

Am folgenden Tage stirbt das Tier an einer Sekundärinfektion mit B. coli. Das Peritoneum ist jedoch mikroskopisch frei von Cholera-vibrionen.

5 Uhr 40 Min.	No. 71a, Meerschweinchen 200 g, erhält $\left. \begin{array}{l} 1,2 \text{ ccm obiger Emulsion} \\ 1 \text{ Oese Cholera} \end{array} \right\}$	intrapertoneal
6 „ 50 „	$\frac{2}{3}$ Vibrionen, $\frac{1}{3}$ Granula	

Folgender Tag: Tier tot, Vibrionen massenhaft in Reinkultur.

Wir dürfen aus diesen Versuchen den überraschenden Schluß ziehen, daß 1 IE. der Choleraimmunkörper, auch wenn sie an bei 60° abgetöteten Cholera-vibrionen festgebunden ist, bei der Auflösung derselben im Peritoneum des Meerschweinchens nicht verschwindet, sondern in einer Form wiedererscheint, welche die Auflösung bis zu vollen $\frac{3}{4}$ Oesen lebender virulenter Cholera von $\frac{1}{10}$ Oese Virulenz herbeizuführen vermag. Wird eine ganze Oese Cholera gegeben, so sterben die Tiere, auch wenn theoretisch sogar 1,2 IE., an tote Cholera-bakterien gebunden, ihnen zur Verfügung stehen. Es hängt dies unserer Auffassung nach damit zusammen, daß die Auflösung der Cholera-vibrionen und das dadurch bedingte Freiwerden der an sie gebundenen Ambozeptormengen eine gewisse Zeit erfordert, während welcher die lebenden Vibrionen eine nicht unbedeutliche Vermehrung erfahren.

Wir müssen nun weiter fragen: Was nützt den virulenten Bakterien ihre gesteigerte Affinität für die Ambozeptoren, wenn sie dieselben weder durch ihren Lebensprozeß vernichten können noch auch bei ihrer eigenen Zerstörung verbrauchen? Demgegenüber möchten wir auf die schöne Arbeit von Radziewsky, Untersuchungen zur Theorie der bakteriellen Infektion (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVII. 1901) verweisen, wo diese Verhältnisse sehr lichtvoll auseinandergesetzt sind. Wir führen einige Stellen der Arbeit wörtlich an.

„In der Wirklichkeit ist sowohl die Bauchhöhle als auch das Blutgefäßsystem ihrem Umfang nach für den mikroskopischen Mikroben unendlich groß. Schon bei normalen Bedingungen ist es unmöglich anzunehmen, daß jede Volumeinheit der Bauchhöhle unbedingt gleichwertig sei einer jeden anderen Einheit nach ihrem Inhalte, nach dem

Charakter der darin enthaltenen Elemente. Die Ernährung der Zellen der darin enthaltenen Organe, der Stoffwechsel im allgemeinen, d. h. die Assimilation gewisser Stoffe, die Dissimilation anderer schaffen solche Bedingungen, welchen zufolge an einer Stelle der Bauchhöhle sich gar nicht ganz dasselbe abspielt als an einer anderen Stelle.“

„Die bakterizide Substanz wirkt auf den Mikroben, indem sie mit ihm eine Verbindung eingeht. Das ist der zweite Punkt der gegenwärtigen Vorstellungen von der Wirkung der bakteriziden Stoffe. Stellen wir uns vor, daß in einer gewissen Volumeinheit der peritonealen Flüssigkeit sich ein gewisses Quantum bakterizider Stoffe einerseits und eine gewisse Menge Mikroben andererseits findet. Die bakteriziden Stoffe gehen — dank ihrer spezifischen Eigenschaften — eine Verbindung ein mit den sich daselbst befindenden Mikroben, die Mikroben — wie man sich auszudrücken pflegt — fixieren auf sich diese Substanzen. Infolgedessen wird die genannte Volumeinheit von bakteriziden Stoffen frei, d. h. es werden sich darin wieder Bedingungen herstellen, welche für die weitere Vermehrung von stärkeren Mikroben, die sich eben daselbst oder in der benachbarten Volumeinheit vorfinden, günstig sind. Auf solche Weise ist es leicht denkbar, daß in den verschiedenen Punkten der Bauchhöhle, des Blutes oder eines beliebigen anderen Organes eine beständige Schwankung in der Spannung der bakteriziden Stoffe stattfinden muß.“

„Eben wegen der Anpassungsfähigkeit der Mikroben genügt schon die bloße Schwankung in der Spannung der bakteriolytischen Substanzen dazu, daß die stärkeren Individuen sich vermehren könnten, ungeachtet der Zerstörung anderer Individuen in der Nachbarschaft.“

Zum Schluß dieser Abhandlung wollen wir noch der Frage näher treten, ob die Fixierung der Ambozeptoren an die Bakterien eine sehr feste ist — eine Bindung im chemischen Sinne — oder nur eine lockere Adsorption durch Flächenattraktion.

Um uns hierüber ein Urteil zu bilden, fällten wir Ziegencholeraserum mit frischen Cholerakulturen aus, wuschen dann die abzentrifugierten Vibrionen mit immer neuen Mengen steriler physiologischer Kochsalzlösung, wobei selbstverständlich nach jeder Waschung von neuem zentrifugiert wurde, bis der Berechnung nach jede Spur der ungebundenen Ambozeptoren entfernt sein mußte. Den schließlich erhaltenen Bodensatz emulsierten wir in einem gemessenen Quantum Kochsalzlösung und ließen die Emulsion dann längere Zeit im Eisschranke resp. bei Zimmertemperatur stehen; darauf wurde von neuem scharf zentrifugiert, die ganze klare Flüssigkeit vorsichtigst abgegossen und dann in einem Spitzglas über Nacht der spontanen Sedimentation überlassen. Es geschah dies, um auch den letzten Rest von eventuell in der Flüssigkeit vorhandenen mit Ambozeptoren beladenen Choleravibrionen zu entfernen¹⁾.

Der naheliegende Weg, diese Aufschwemmung durch Berkefeld-Kerzen zu filtrieren, konnte nicht beschritten werden, da Kontrollversuche ergaben, daß ein nicht zu vernachlässigender Bruchteil von Ambozeptoren im Filter zurückbehalten wurde.

Wir überzeugten uns, daß unter diesen Versuchsbedingungen aus den mit Ambozeptoren gesättigten Vibrionen nur sehr geringe Mengen von Ambozeptoren wieder abgegeben wurden, was sehr wahrscheinlich

1) Die Anwendung des Sedimentationsverfahrens war zulässig, da die benutzte Cholerakultur ihre Bewegungsfähigkeit eingebüßt hat. (cfr. Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 25.)

auch noch auf die letzten Spuren von in der scheinbar klaren Flüssigkeit zurückgebliebenen ambozeptorbeladenen Bakterien zurückzuführen sein dürfte.

Nach unserer Ansicht sprechen die Resultate eher für eine ziemlich feste Bindung als für eine rein physikalische Adsorptionswirkung.

Unsere Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1) Die im Serum eines mit Choleraimmunserum vorbehandelten Tieres auftretenden Antiambozeptoren greifen in die cytophile Gruppe des Ambozeptors ein.

2) Die Antiambozeptoren gegen Choleraimmunkörper besitzen keine Affinität für die Rezeptoren des Cholera vibrio.

3) Die Choleraantiambozeptoren sind relativ stabile Körper, die durch $\frac{1}{2}$ -stündige Erhitzung auf 60° nicht zerstört werden.

4) Auch die Ambozeptoren des Normalserums vermögen die Bildung von Antiambozeptoren im Tierkörper anzuregen.

5) Die Erzeugung von Antiambozeptoren gelingt nicht bei allen Tierspecies gleich leicht und sicher.

6) Die Erzeugung von Antiambozeptoren gelingt auch gegen die Ambozeptoren des Typhusimmun(hunde)serums.

7) Die Antiambozeptoren sind höchst wahrscheinlich als Zellbestandteile aufzufassen, welche eine haptophore Gruppe von analogem Bau wie die Bakterienrezeptoren haben, im übrigen aber in ihrer Konstitution von diesen different sind.

8) Der Rezeptorenapparat des Cholera vibrio ist wahrscheinlich nicht für die Ambozeptoren der verschiedenen Tierspecies spezifisch different.

9) Ueberschüssig an Cholera vibriolen verankerte Choleraambozeptoren werden bei der Bakteriolyse wieder frei und aktionsfähig.

10) Die Cholera bakterien sind außer stande durch ihren Lebensprozeß die Choleraimmunkörper zu zerstören.

11) Bei der Bakteriolyse der Cholera bakterien ist ein Verbrauch von Choleraimmunkörpern nicht nachzuweisen.

Königsberg i. Pr., 9. April 1903.

Nachdruck verboten.

Einige Händedesinfektionsversuche nach vorheriger künstlicher Infektion der Hände mit *Micrococcus tetragenus* und *Staphylococcus pyogenes aureus*.

[Aus dem Institut für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg. Abteilung für Hygiene. Vorstand: Prof. Bonhoff.]

Von Dr. Engels, z. Z. 1. Assistent am hygienischen Institute zu Posen.

Die Versuche zur bakteriologischen Prüfung von Händedesinfizientien waren bisher von mir so ausgeführt worden, daß ich nach Fürbringers Vorgange die gewöhnliche Tageshand mit ihrem jeweiligen Bakteriengehalte dem von Paul und Sarwey eingeführten Nachprüfungsverfahren mit Hilfe des sterilen Kastens aussetzte¹⁾.

Es erschien nun angebracht, festzustellen, ob die durch die früheren Versuche erprobten Lysoform-, Bacillol- und Sublaminalkohollösungen,

1) Engels, Arch. f. Hygiene. Bd. XLV. Heft 3 u. 4.

insbesondere wiederum in ihrer 2-proz. resp. 2-prom. Konzentration, auch anderen Prüfungsmethoden standzuhalten im stande seien.

Es sollte in erster Linie die neuerdings von Krönig und Blumberg eingeführte Methodik mit Einschlebung des Tierexperimentes versucht werden.

Krönig und Blumberg¹⁾ waren es, welche wiederholt gegen die Uebertragung der Hautabschabsel auf künstliche Nährböden nach erfolgter Desinfektion als ein nicht den praktischen Verhältnissen entsprechendes Verfahren Front gemacht hatten. Sie setzten daher an ihre Stelle die Ueberimpfung auf empfängliche Versuchstiere. Dazu war es natürlich notwendig, daß vor der Desinfektion die Hände mit bestimmten Bakterienarten beschickt wurden, welche für unsere Laboratoriumstiere höchst pathogen, für den Menschen sich aber als unschädlich erwiesen. Zu diesem Zwecke wählten Krönig und Blumberg den diesen Anforderungen gerecht werdenden *Micrococcus tetragenus*.

In ihrer gemeinsamen Arbeit: Vergleichende Untersuchungen über den Wert der mechanischen und Alkoholdesinfektion der Hände gegenüber der Desinfektion mit Quecksilbersalzen, speziell dem Quecksilberäthylendiamin²⁾ heißt es auf p. 3: „Da das Tierexperiment allen Verhältnissen, wie sie bei der Operation in Frage kommen, vollständig nachkommt, so brauchen wir daher bei unserer Versuchsanordnung das Desinficiens nicht vorher chemisch unwirksam zu machen, sondern wir dürfen ähnlich wie bei der Operation, so auch hier beim Tierexperiment, die Hände dann als genügend desinfiziert ansehen, wenn auf den Tierkörper übertragene Hautabschabsel keine im Tierkörper mehr entwickelungsfähigen Keime enthalten. Durch die Einschaltung des Tierversuchs ist also die ganze Methode der Prüfung der Händedesinfektionsverfahren den praktischen Verhältnissen eng angepaßt.“

Diese soeben beschriebene Krönig-Blumbergsche Methodik wurde auch bei unserem sogleich zu erwähnenden Versuche zu Grunde gelegt.

Die *Tetragenus*-Kultur, welche in unseren Versuche verwandt werden sollte, wurde mir durch Herrn Prof. Krönig resp. Herrn Dr. Fütth in Leipzig in dankenswerter Weise übermittelt, so daß wir mit demselben Materiale zu arbeiten im stande waren, wie Krönig und Blumberg.

Um eine höchstmögliche Virulenz zu erzielen, wurde die Kultur zunächst mehrere Male hintereinander durch eine Maus geschickt. Trotz Verimpfung großer Mengen Materials trat indes der Tod infolge *Tetragenus*-Septikämie erst nach 3 Tagen regelmäßig ein. Ich mußte mich mit diesem Virulenzgrade zufrieden geben, da es mir nicht gelang, durch noch weitere Ueberimpfungen die Pathogenität dieses *Tetragenus* für Mäuse zu steigern.

Ca. 10 Tage nach Eingehen der letzten Maus wurde mit der aus Milz gewonnenen *Tetragenus*-Reinkultur, und zwar mit frischer 24-stündiger Kultur, der erste Versuch gemacht.

Herr Prof. Bonhoff hatte die Freundlichkeit, denselben vorzunehmen. Geprüft wurde der 2-prom. Sublaminalkohol.

Die Versuchsanordnung war genau dieselbe, deren sich Krönig und Blumberg bedient hatten.

Nach der Antrocknung der *Tetragenus*-Traubenzuckerbouillon-aufschwemmung an den Händen wurden letztere 5 Minuten lang kräftig

1) Krönig, Centralbl. f. Gynäk. 1899. No. 45. — Krönig und Blumberg, Beiträge zur Händedesinfektion. Monographie. Leipzig (Georgi) 1900.

2) Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 29 u. 30.

mit steriler Seife und steriler Bürste in sterilem heißen Wasser gewaschen, darauf die Seife mit sterilem Wasser von den Händen entfernt und nun während 5 Minuten die Desinfektion mit 2-prom. Sublaminalkohol mit Hilfe eines sterilen Flanelllappens vorgenommen.

Die möglichste Entfernung der Desinfizientien geschah durch Abspülen der Hände mit sterilem Wasser (2 l) und darauffolgender steriler 1-proz. Peptonkochsalzlösung (1 l).

Die Entnahme geschah in der Krönig-Blumbergschen Form (l. c.):

„Es wird in die eine Hohlhand ein Teelöffel voll sterilisierten Marmorstaubes geschüttet und eine kleine Menge neutraler sterilisierter Traubenzuckerbouillon hinzugetan, dann wird der mit Flüssigkeit versetzte Marmorstaub auf beiden Händen energisch verrieben, ungefähr 5 Minuten lang, schließlich wird unter allmählichem Zusatz von Traubenzuckerbouillon der Marmorstaubbrei durch festes Aneinanderdrücken der Hände ausgepreßt und in einer sterilen Schale aufgefangen.“

Diese Marmorstaubaufschwemmung wurde zu gleichen Teilen 5 Mäusen (jeder ca. 1 ccm) unter die Rückenhaut gebracht.

Zur Kontrolle wurde mit einem Hölzchen vor Beginn der Händewaschung und der Desinfektion ein Teil der *Tetragenus*-Kultur von den Händen abgekratzt, dieses Hölzchen in ca. 2 ccm sterilen Wassers gründlich abgespült und diese Spülflüssigkeit einer Maus subkutan injiziert. Gleichzeitig wurde von dieser Flüssigkeit ein Ausstrich auf Agar gemacht.

Das Resultat war folgendes:

Keine der 5 Mäuse, welche mit der *Tetragenus*-Marmorstaubaufschwemmung geimpft waren, ging ein.

Das wäre ja ein günstiges Ergebnis gewesen, wenn uns nicht die Kontrollmaus im Stiche gelassen hätte. Trotzdem auf dem schräg erstarrten Agar *Tetragenus* üppig gewachsen war, blieb die mit demselben Materiale geimpfte Maus am Leben.

Die Virulenz des *Tetragenus* war demnach viel zu gering, als daß man bei Verwendung der Krönigschen Methode Resultate hätte erhalten können. Die Methode setzt voraus, daß zum mindesten einige wenige *Tetragenus*-Keime, auf die Maus verimpft, den Tod derselben mit Sicherheit herbeiführen. Unsere Kultur vermochte nur in sehr großen Dosen, $\frac{1}{10}$ 24-stündiger Agarkultur, die meisten Mäuse bei subkutaner Impfung prompt zu töten.

Trotz nachheriger wochenlanger Bemühungen gelang es mir nicht, durch Tierpassagen, durch Ueberimpfungen von Maus auf Maus, von Maus auf Meerschweinchen, von Meerschweinchen auf Maus, von Meerschweinchen auf Meerschweinchen etc., die auch augenblicklich noch fortgesetzt werden, eine hinreichende Virulenz des *Tetragenus* zu erreichen.

Es mußte deshalb von den Versuchen nach Krönig-Blumbergscher Methode einstweilen Abstand genommen werden.

Indes die Ansichten über die Verwendbarkeit des Tierexperimentes gegenüber den kulturellen Verfahren gehen weit auseinander.

Schon im Jahre 1891 äußerte sich Behring¹⁾ in einer Kontroverse gegen Geppert über diese Frage mit folgenden Worten:

„Nun können wir durch das Tierexperiment nicht soviel erfahren, als durch den Kulturversuch, nämlich nur, ob die Bakterien noch in-

1) Behring, Die Sublimatfrage und Herr Geppert. (Dtsche med. Wochenschr. 1891. No. 29 u. 30. — Weiterhin siehe Behring, Berl. klin. Wochenschr. 1890. p. 240; dann: Bekämpfung der Infektionskrankheiten. p. 41.

fektiös sind, nicht aber, ob sie auch abgetötet sind; und bekanntlich können unter Umständen pathogene Bakterien noch leben, ohne zu infizieren... Hieraus kann man auch entnehmen, daß man tatsächlich die Infektionsgefahr nur dann mit Sicherheit ausschließen kann, wenn durch schnell wirkende Desinfektionsmittel eine Abtötung der in Frage kommenden Infektionserreger erzielt wird. Darüber kann aber, wie gesagt, nur der Kulturversuch, nicht das Tierexperiment entscheiden.“ Weiterhin sagt Behring an einer anderen Stelle derselben Arbeit: „Aus den später zu erwähnenden Versuchen geht mit Sicherheit hervor, daß man nach der Sublimatbehandlung der Sporen noch Kulturen bekommt, wenn die geimpften Tiere ganz gesund bleiben; und es ist ja von vornherein klar, daß es so sein muß. Der völligen Abtötung geht eben ein Stadium der beeinträchtigten Lebensfunktionen der Bakterien voraus, zu denen auch die Fähigkeit gehört, Tiere zu infizieren. Wir kennen zwar Zustände der Bakterien, in denen sie noch lebensfähig, aber nicht mehr virulent sind; wir kennen jedoch nicht das Umgekehrte.“

Es würde zu weit führen, wollte ich an dieser Stelle noch näher auf die angeschnittene Frage eingehen. Wir haben gehört, daß Behring sehr gewichtige Einwendungen gegen das Tierexperiment gegenüber den kulturellen Methoden erhoben hat, dabei gestützt auf seine Versuche und seine Erfahrungen.

Ich konnte mich also mit Erfolg der künstlichen Infektion der Hände mit diesem *Tetragenus*-Stamme in einer Reihe von Versuchen bedienen, bei denen an Stelle des Tierexperimentes wieder das kulturelle Verfahren zum Nachweise lebensfähiger Bakterien nach erfolgter Desinfektion trat. Es kam wiederum, wie auch in meinen oben angegebenen Arbeiten, die Paul Sarweysche Nachprüfungsmethodik mit Hilfe des sterilen Kastens zur Verwendung, nur mit der Abweichung, daß statt der normalen Tageshand jetzt die künstlich mit *Tetragenus* infizierte Hand als Testobjekt diente.

Mit Hilfe kleiner Quantitäten von Traubenzuckerbouillon wurden 5 24-stündige Agarkulturen mit einer starken, großen, sterilen Platinöse vom Nährboden abgekratzt und in ein kleines steriles Schälchen gebracht. Diese Bakterienaufschwemmung verrieb ich auf der Oberhaut meiner Hände, indem ich durch mittelkräftig ausgeführte Waschbewegungen für eine gleichmäßige Verteilung der Kulturen an Händen und Fingern sorgte. Die Kulturen ließ ich sodann 5 Minuten antrocknen.

Als Kontrolle diente mir mit regelmäßig positivem Erfolge die Abimpfung von der trockenen Hand (siehe folgende Tabelle).

In einem Punkte trat nun noch eine kleine Aenderung in dem bisherigen Verfahren ein. Bislang waren von dem Wasch- resp. dem Sandbadewasser nur geringe Quantitäten (2 ccm) zur Verarbeitung zu Platten und somit zur Prüfung auf Keimen gekommen.

Hier ließ ich das in meinen Abhandlungen über Wassersterilisation¹⁾ beschriebene und vorher erprobte Verfahren eintreten, wo ich den Nachweis noch lebender Mikroorganismen im Wasser derart führte, daß ich die gesamte Versuchsmenge in einem Nährboden, in 1-proz. Peptonkochsalzlösung umwandelte und so die eventuell vorhandenen Keime sofort unter günstige Ernährungs- und Wachstumsbedingungen setzte.

1) Engels, Das Schumburgsche Verfahren der Trinkwasserreinigung mittels Brom. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXI. 1902. No. 13.) — Weitere Studien über die Sterilisation von Trinkwasser auf chemischem Wege. (Traubesches Verfahren mit Hilfe von Chlorkalk.) (Ibid.)

In genau derselben Weise fügte ich bei den vorliegenden Versuchen dem gesamten Wasch- resp. dem Sandbadewasser so viel einer sterilen konzentrierten und im sterilen Kasten befindlichen Peptonkochsalzlösung zu, bis ich das gewünschte Nährsubstrat erhielt. Die dazu nötigen Utensilien befanden sich natürlich im sterilen Kasten, in dem ja auch der ganze Prozeß vor sich ging. Vorbedingung für dieses Vorgehen war natürlich, daß der *Micrococcus tetragenus* sich in Peptonwasser reichlich vermehrt, auch wenn er nur in wenigen Exemplaren in diesen Nährboden gelangt. Wir haben uns durch eigene Versuche davon überzeugt, daß das wirklich der Fall ist.

Wie alle gegossenen Platten, so kamen auch die beiden Kölbchen eines jeden Versuches in den Brüttschrank bei 37° C. Nach 2-tägigem Verweilen bei Brüttemperatur wurden 2 ccm des Inhaltes eines jeden Kölbchens zur Agarplatte verarbeitet und letztere bis zum Schluß der Beobachtungszeit (8 Tage) der übrigen Platten des Versuches bei 37° C aufbewahrt.

Nach dieser soeben beschriebenen Versuchsanordnung wurden die nachfolgenden 15 Versuche von mir angestellt, und zwar je 5

- mit 2-proz. Lysoformalkohol
- „ 2- „ Bacillolalkohol und
- „ 2-prom. Sublaminalkohol.

Tabelle 2.

No. des Versuchs	2-proz. Lysoformalkohol				2-proz. Bacillolalkohol				2-prom. Sublaminalkohol			
	Peptonwaschwasser		Peptonsandbad		Peptonwaschwasser		Peptonsandbad		Peptonwaschwasser		Peptonsandbad	
	Trübung an	Keimgehalt	Trübung an	Keimgehalt	Trübung an	Keimgehalt	Trübung an	Keimgehalt	Trübung an	Keimgehalt	Trübung an	Keimgehalt
1	—	—	2. Tage	Kart.- Bacill.	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	1. Tage	Kart.- Bacill.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Die Versuche sind demnach sehr günstig ausgefallen. Trotzdem in allen Fällen auf den Kontrollplatten (Abimpfung von der trockenen Hand) sehr zahlreiche *Tetragenus*-Kolonien gewachsen waren, konnten nach der Desinfektion der Hände in keiner Phase der Versuchsanordnung solche Keime mehr nachgewiesen werden. Wie Tabelle 2 zeigt, waren auch die Peptonwaschwasser- und Peptonsandbadlösungen in allen Versuchen frei von *Tetragenus*. In zwei Fällen waren auf den gegossenen Platten des betreffenden Kölbcheninhaltes (Versuch 1 der Lysoformalkoholreihe — Peptonsandbad und Versuch 4 derselben Reihe — Peptonwaschwasser) *Kartoffelbacillen* gewachsen.

Im übrigen waren neben „sterilen“ Platten in einzelnen Fällen (siehe Tabelle 1) noch Platten mit „wenigen“ Keimen zu konstatieren. Die jedesmal gefundene Keimzahl gibt Tabelle 1 wieder. Ich betone nochmals, daß es sich hier in keinem Falle um *Tetragenus*-Kokken gehandelt hat.

Unter den gewachsenen Kolonien befanden sich auch *Staphylo-*

kokkenkolonien, die ich in der Tabelle absichtlich nicht besonders markiert habe, da es sich hier nur um den Nachweis von eventuellen *Tetragenus*-Keimen handeln und nur solche Keime ausdrücklich hervorgehoben werden sollten, falls sie zur Entwicklung gekommen wären.

Der Ausfall der Versuche ist daher als positiv zu bezeichnen.

Prozentuarisch verhielt sich das Resultat folgendermaßen:

Desinficiens	Sterile Platten	Wenige Keime (1—20)	Viele Keime (20—80)	Sehr viele Keime (über 80)
2-proz. Lysoformalkohol	83,1 Proz.	16,9 Proz.	—	—
2-proz. Bacillolalkohol	81,5 „	18,5 „	—	—
2-prom. Sublaminalkohol	93,9 „	6,1 „	—	—

Mit 2-proz. Lysoformalkohol und 2-proz. Bacillolalkohol erzielte ich in diesem Falle bedeutend mehr sterile Platten als bei meinen früheren Versuchen.

Ein Gleiches konnte ich für den 2-prom. Sublaminalkohol feststellen, wengleich hier nur ein geringes Plus gegen früher verzeichnet werden konnte.

Schlußergebnis dieser Versuchsreihe:

Nach künstlicher Infektion der Hände mit *Micrococcus tetragenus* gelingt es mit Hilfe der drei geprüften Desinfektionslösungen, dem 2-proz. Lysoformalkohol, dem 2-proz. Bacillolalkohol und dem 2-prom. Sublaminalkohol, mit Sicherheit diese Keime an den Händen zu vernichten und unschädlich zu machen.

Die zweite Reihe von Versuchen, deren Resultate ich hier kurz wiedergeben möchte, beschäftigte sich mit der künstlichen Infektion der Hände mit einem Eitererreger, dem *Staphylococcus pyogenes aureus*, vor der Desinfektion.

Es war mir aufgefallen, daß durch keines der von mir geprüften Desinfizientien die Staphylokokken von den Händen mit Sicherheit entfernt werden konnten. Allerdings waren in einer Anzahl von Versuchen keine eitererregenden Keime nachgewiesen; in der Mehrzahl jedoch ließen sich durch unsere Kulturverfahren solche konstatieren, freilich nach Benutzung der alkoholischen Lösungen von Lysoform, Bacillol und Sublamin in 2-proz. resp. 2-prom. Konzentration stets nur einige wenige. Besonders kamen dieselben bei Verwendung des Sublaminalkohols so vereinzelt vor, daß ich geneigt war, anzunehmen, diese Keime seien zufällig nicht von meinen Händen, sondern beim Gießen der Platten aus der Umgebung auf den Nährboden gekommen, zumal die Kolonien schon meist 24 Stunden nach dem Versuche ganz oberflächlich lagen.

Um mir über diesen Punkt Aufklärung zu verschaffen, stellte ich die folgenden Versuche an.

Die künstliche Imprägnierung der Haut, der Hände und Finger geschah mit dem *Staphylococcus pyogenes aureus*.

Aus einem Furunkel wurde derselbe frisch rein gezüchtet. Zum Beschicken der Hände wurde gleich die erste, also die virulenteste Generation benutzt. Die Traubenzuckerbouillonaufschwemmung von meist 4 Agarröhrchen wurde durch Waschbewegungen wiederum gleichmäßig auf Händen und Fingern verteilt.

Auch im Verlaufe dieser Versuchsreihe wurde das Washwasser und das Sandbadewasser regelmäßig im sterilen Kasten in 1-proz. Peptonkochsalzlösung übergeführt und nachher weiter behandelt, wie ich bei den *Tetragenus*-Versuchen schon erwähnt habe.

Der Gang der übrigen Versuchsanordnung blieb derselbe wie in der ersten Versuchsreihe mit Hilfe des Paul Sarweyschen Kastens. Tabelle 3 und 4 mögen die Resultate dieser Versuchsreihe veranschaulichen.

Tabelle 4.

No. des Versuches	2-proz. Lysoformalkohol				2-proz. Bacillolwasser				2-prom. Sublaminalkohol			
	Peptonwaschwasser		Pepton-sandbad		Peptonwaschwasser		Pepton-sandbad		Peptonwaschwasser		Pepton-sandbad	
	Trübung am	Keimgehalt	Trübung am	Keimgehalt	Trübung am	Keimgehalt	Trübung am	Keimgehalt	Trübung am	Keimgehalt	Trübung am	Keimgehalt
1	1. Tage	Kart.-Bacill.	1. Tage	Staph. p. aur.	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	1. Tage	Kart.-Bacill.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Das Resultat war demnach folgendes:

Zunächst fiel die Kontrolle, die Entnahme von Keimen von der trockenen Hand, stets positiv aus.

Was den Desinfektionserfolg selbst angeht, so waren in der Lysoformalkoholreihe in 4 von 5 Versuchen Staphylokokkenkolonien trotz der Desinfektion der Hände noch zur Entwicklung gekommen.

Versuch 1	zahlreiche Kolonien
„ 2	1 Kolonie
„ 3	2 Kolonien
„ 5	2

Auffallend ist, daß im ersten Versuche der Keimgehalt des Sandbades ein relativ hoher ist. Die Ursache dieser mit den früheren Desinfektionsergebnissen nicht übereinstimmenden hohen Keimzahl konnte nicht eruiert werden.

In der zweiten Versuchsreihe mit 2-proz. Bacillolalkohol erwiesen sich 4 Versuche völlig frei von Staphylokokken. Dagegen waren in einem Versuche — Versuch 1 — 3 Kolonien gewachsen.

Der 2-prom. Sublaminalkohol hatte in 2 Versuchen je 1 Kolonie des *Staphylococcus pyogenes aureus* noch zur Entwicklung kommen lassen.

In den Peptonkölbchen konnten nur 1mal (Peptonsandbadewasser des ersten Versuches der 2-proz. Lysoformalkoholreihe) Staphylokokken nachgewiesen werden, in zwei anderen Fällen dagegen der Kartoffelbacillus (Peptonwaschwasser in Versuch 1 und 3 der Lysoformalkoholreihe).

Im übrigen waren die Keimzahlen nach der Desinfektion, in Prozenten ausgerechnet, folgende:

Desinficiens	Sterile Platten	Wenige Keime (1—20)	Viele Keime (20—80)	Sehr viele Keime (über 80)
2-proz. Lysoformalkohol	72,3 Proz.	26,2 Proz.	1,5 Proz.	—
2-proz. Bacillolalkohol	84,6 „	15,4 „	—	—
2-prom. Sublaminalkohol	92,3 „	7,7 „	—	—

Blicken wir nun zurück auf die Ergebnisse der letzten 15 Versuche, so muß ich zugeben, daß es mir nicht gelungen ist, durch eine der drei

geprüften Desinfektionslösungen sämtliche Staphylokokkenkeime mit Sicherheit auf der Haut der Hände zu vernichten. Die Resultate meiner übrigen Desinfektionsversuche haben demnach bezüglich des Staphylokokkenbefundes sowohl als auch der einzelnen Prozentzahlen, wie sie in oben stehender, kleiner Tabelle für die verschiedenen Platten aufgezeichnet sind, Bestätigung gefunden.

Bedenken wir, daß bis jetzt noch kein chemisches Desinficiens bekannt ist, welches in einer für den menschlichen Organismus unschädlichen Konzentration mit absoluter Gewißheit sämtliche Eitererreger der Hände während einer Desinfektion abtötet oder unschädlich macht, so ist, jedenfalls von diesem Standpunkte aus, der immerhin verschwindend kleine Staphylokokkenbefund nach der Desinfektion mit Lysoform-, Bacillol- und Sublaminalkohol in 2-proz. resp. 2-prom. Lösung nicht von wesentlicher Bedeutung. Ich glaube, wir könnten und würden es mit Freuden begrüßen, wenn alle in der Praxis bisher gebräuchlichen Desinficienten imstande wären, einen derartig hohen desinfektorischen Effekt zu zeitigen, wie er den drei geprüften Lösungen, dem 2-proz. Lysoformalkohol, dem 2-proz. Bacillolalkohol und dem 2-prom. Sublaminalkohol, nach meinen Versuchen in der Tat zukommt.

Unterdessen hat aber meine schon früher ausgesprochene Ueberzeugung, daß es sich bei den wenigen auf den Platten nach der Desinfektion auftretenden Staphylokokkenkolonien nicht um die zur Infektion der Handoberflächen benutzten, sondern um andere, aus der Luft oder von der Kleidung stammende Keime handelt, sich entschieden vertieft, und es erschien mir wünschenswert, wenigstens einen Versuch der Differenzierung dieser Kokken vorzunehmen. Der Umstand, daß die auf den Platten auftretenden Staphylokokkenkolonien sich morphologisch und kulturell von den verwendeten Reinkulturen nicht unterscheiden lassen, spricht noch nicht für Identität derselben. Wir haben aber Methoden, die in viel feinerer Weise eine Wiedererkennung bestimmter Bakterienarten gestatten. Um kurz zu sein, will ich hier nur auf die Arbeit von Kolle und Otto¹⁾ verweisen, in der festgestellt ist, daß es durch Immunisierung von Kaninchen mit verschiedenartigen Kokken, z. B. aus der Luft oder aus Eiterungsprozessen stammenden, gelingt, Sera zu erhalten, die in starken Verdünnungen agglutinierend nur wirken auf Arten von Kokken, welche mit den zur Immunisierung der Tiere verwendeten identisch sind. Dieser Tatsache kann man sich in ausgezeichneter Weise zur Feststellung des Umstandes bedienen, ob die nach der Händedesinfektion auf meinen Platten wachsenden vereinzelt Kokkenkolonien von den zur Infektion der Handoberfläche verwendeten oder aus der Umgebung, aus der Luft oder von meiner Kleidung stammen.

Ich habe also seit einiger Zeit mehrere Kaninchen mit verschiedenartigen Staphylokokken immunisiert, um agglutinierende Sera zu erhalten. Bei den nicht aus Eiterungsprozessen stammenden Kokken hat das Verfahren auch nach kurzer Zeit zur Gewinnung von Blutsera geführt, die in einer Verdünnung von 1 : 200 bereits agglutinierend auf die zur Immunisierung verwendete Bakterienart wirken. Bei den aus Eiterungsprozessen stammenden Kokken bin ich bisher nicht zu einem Erfolg gelangt. Nach mehrfachen Einspritzungen steigender Dosen der Eiterkokken war in dem gewonnenen Blutserum auch nicht einmal in Verdünnung von 1 : 20 eine agglutinierende Wirkung nachzuweisen. Da dieser Befund in Uebereinstimmung ist mit den anderwärts gewonnenen

1) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLI.

Erfahrungen, so muß ich abwarten, bis auch bei den mit Eiterkokken behandelten Tieren Agglutinationswirkung des Blutes sich einstellt, um dann meine letzten Versuche der Händedesinfektion noch einmal zu wiederholen.

Ich möchte nun diese Arbeit nicht beschließen, ohne einer unglücklichen Folgeerscheinung der künstlichen Infektion mit dem frisch aus einem Furunkel gezüchteten und in 1. Generation benutzten *Staphylococcus pyogenes aureus* Erwähnung getan zu haben. Ich hatte mir dabei eine Furunkulose beider Hände mit teilweiser Beteiligung des rechten Unter- und Oberarmes und beiderseitige Lymphangitis und Lymphadenitis bis in die Achselhöhle hinein zugezogen, die ein chirurgisches Eingreifen in der Klinik notwendig machte. Es hatten sich 36 Furunkel nacheinander gebildet. Die Folgen in Gestalt bläulichroter Flecken sind zum Teil jetzt noch sichtbar. Die neuen Nachschübe, welche ununterbrochen auftraten, zeitigten stets kleinere Furunkel, schließlich nur noch pustelartige Gebilde, so daß man an eine allmählich eingetretene Immunität denken könnte.

Nun könnte man leicht geneigt sein, in diesem Falle einer ungenügenden Wirksamkeit der 3 Desinfektionslösungen die Schuld zuzuschreiben. Ich stehe in keiner Weise auf diesem Standpunkte; es ist bekannt, daß bei Desinfektionsprüfungen ein großes Gewicht auf eine gut gepflegte, nicht lädierte Haut gelegt werden muß. Dem Umstande, daß ich diese Versuche etwas zu sehr forciert habe, und dadurch mir die Gelegenheit genommen war, die nach jedem Versuche alterierte Haut sich erst wieder erholen zu lassen, ist die Entstehung der Furunkulose einzig und allein zuzuschreiben.

Meist wurden an einem Tage zwei Versuche ausgeführt, der eine vormittags und der andere gegen Abend. Dabei konnte von einer Schonung der Haut nicht die Rede sein; sie wurde vielmehr an vielen Stellen rissig, und der *Staphylococcus* fand einen bequemen und sicheren Schlupfwinkel gegenüber den Desinfizientien, um so mehr, als ich leider unterlassen habe, die irritierte Haut meiner Hände durch Behandlung mit indifferenten Pasten etc. in der richtigen Weise vor Schaden zu bewahren.

Es spricht diese Folgeerscheinung der künstlichen Infektion als Resultat einer Desinfektionsprüfung von dem eben präzisierten Gesichtspunkte aus meines Erachtens durchaus nicht gegen die bisher mit den gleichen Desinfektionslösungen erzielten Erfolge.

Inhalt.

- | | |
|---|---|
| <p>Cohn, Ludwig, Zur Kenntnis einiger Trematoden, p. 35.</p> <p>Engels, Einige Händedesinfektionsversuche nach vorheriger künstlicher Infektion der Hände mit <i>Micrococcus tetragenus</i> und <i>Staphylococcus pyogenes aureus</i>, p. 84.</p> <p>Jensen, C. O., Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen, p. 28.</p> <p>Jochmann, Georg u. Moltrecht, 20 Fälle von Bronchopneumonie bei Keuchhustenkindern, hervorgerufen durch ein influenzaähnliches Stäbchen: <i>Bacillus pertussis</i> Eppendorf, p. 15.</p> <p>Köppen, A., Tuberkulosestudien, p. 6.</p> <p>Müller, Paul Theodor, Weitere Studien über das Laktoserum. III, p. 48.</p> <p>Omelianski, V., Beiträge zur Differential-</p> | <p>diagnostik einiger pathogener Bakterienarten, p. 1.</p> <p>Otto, E., Weitere Beiträge zur Agglutination der Staphylokokken, p. 44.</p> <p>Pfeiffer, E. u. Friedberger, E., Weitere Beiträge zur Theorie der bakteriolytischen Immunität, p. 70.</p> <p>Rodella, A., Beitrag zur Frage der Bedeutung anaerober Bakterien bei Darmkrankheiten, p. 14.</p> <p>Turró, E., Tarruella, J. u. Presta, A., Die Bierhefe bei experimentell erzeugter Streptokokken- und Staphylokokkeninfektion, p. 22.</p> <p>Zschokke, F., Ein neuer Fall von <i>Dipylidium caninum</i> (L.) beim Menschen, p. 42.</p> |
|---|---|

Nachdruck verboten.

Beobachtungen über die Geißeln des Tetanusbacillus.

[Aus dem hygienischen Institut d. Kgl. Universität Turin. Direktor:
Prof. Dr. L. Pagliani.]

Von Dr. Silvio de Grandi.

(Ins Deutsche übertragen von Dozent A. Wihlfahrt, Turin.)

Mit 12 Figuren.

Eine morphologische Eigentümlichkeit des Tetanusbacillus, die Geißeln, einer Prüfung zu unterziehen und sie auch in Verbindung mit ihrem funktionellen Aequivalent, der Bewegung, ins Auge zu fassen, schien mir eines gewissen Interesses nicht bar zu sein, eine Annahme, die ihre Berechtigung schon in der Tatsache findet, daß die wenigen Forscher, die sich bisher mit diesem Argument beschäftigt haben, zu sehr ungleichen Schlüssen gekommen sind.

Rudolf Schwarz beschrieb als erster im Jahre 1891 den Tetanusbacillus und seine Geißeln¹⁾. Mit Material des Herrn Prof. Tizzoni, aus Bouillonkulturen unter H nach Fraenkel, förderte er mit der Loefflerschen Färbungsmethode eine einzige Geißel zu Tage, die gebuchtet und 1—4 mal so lang war, wie der Mikrobekörper, und an einer seiner Extremitäten oder aber seitwärts in ihrer Nähe sich vorfand, leicht losgelöst werden konnte und zur Zeit der Sporenbildung verschwand.

Dieser Befund wurde erst 1895 von Kanthack und Connell nachgeprüft. Ihre dabei erhaltenen, von den vorigen stark abweichenden Resultate kamen sozusagen erst 2 Jahre später durch ihre Publikation im Journal of Pathology and Bacteriology²⁾ zur allgemeinen Kenntnis und waren seiner Zeit auf Basis eines Agarstrichkulturen in Buchnerschen Röhren entstammenden Materials erhalten worden, und dies in zwei verschiedenen Entwicklungsperioden, 4 und 14 Tage nach erfolgter Einsäung. Nach diesen Autoren sind die Tetanusbacillen reich an Geißeln, die zahlreicher (20—30) sind und feiner gekrümmt, aber im Vergleich mit dem Bacillenkörper weniger lang als die des Typhusbacillus.

Einige dieser besitzen zwischen so beschaffenen Geißeln, die unterschiedshalber Primärgeißeln genannt werden, noch 2 oder 3 stärkere und deutlich spirale Geißelprozesse, die sogenannten Sekundärgeißeln.

Während erstere in jungen Kulturen zahlreicher zu sein scheinen, zeigen sich letztere in größerer Anzahl in den alten Kulturen, in welchen nach den genannten Autoren sich zuletzt nur noch Bacillen befinden mit einer einzigen Sekundärgeißel und spärlichen, schattenähnlichen Ueberresten der Primärgeißeln. Die gesportete Form ist gewöhnlich ohne Geißeln oder weist nur in seltenen Fällen deren Spuren auf.

Im Jahre 1898 kam W. Votteler beim Studium der Differential-

1) Schwarz, R., Lo sperimentale. 1891. No. 18. p. 373.

2) Kanthack and Connell, The flagella of the tetanus bacillus and other contributions to the morphology of the tetanus bacillus. (The Journal of Path. and Bact. Vol. IV. 1897. No. 4. p. 452.)

diagnose der pathogenen Anaëroben¹⁾ bezüglich der Geißeln des Tetanusbacillus zu Schlüssen, die mit denen Kanthacks und Connells übereinstimmten, doch schreibt er dem Bacillus eine bedeutend größere Anzahl (50—100) Geißeln zu, unterläßt es aber auch gleichzeitig nicht, zuzugeben, daß diese starken Schwankungen unterworfen ist.

Bei diesem Punkte ist man stehen geblieben, und meines Wissens hat sich bis heute kein anderer Forscher direkt mit diesem Argumente beschäftigt.

Die Verfasser der Lehrbücher von 1891 bis heute stützen sich nun, wenn sie diese morphologische Eigentümlichkeit nicht überhaupt vollständig unbeachtet lassen, entweder auf die von dem einen oder dem anderen Verfasser geäußerte Ansicht.

Nicht nur vor 1895, sondern auch später und selbst noch vor ganz kurzer Zeit finden wir Verfasser, die mit oder ohne Zitieren von Schwarz die Existenz einer einzigen Endgeißel feststellten. Andere dann, die der Ansicht von der Vielfältigkeit der Geißeln zuneigen, tun es mit Mißtrauen, ohne die Einzelheiten der Struktur und der Disposition der englischen Autoren zu acceptieren.

So z. B. — um nur bei den bekannteren Autoren zu bleiben — spricht Flügge in seinem Lehrbuch aus dem Jahre 1896²⁾ nicht von den Geißeln des Tetanusbacillus; ebenso schweigen sich hierüber vollständig aus: das Lehrbuch von Miquel und Cambier³⁾ und das andere von Besson⁴⁾, beide aus dem Jahre 1896. Lehmann und Neumann bringen in ihrem Lehrwerke aus demselben Jahre beide Ansichten vor, unterlassen es dabei⁵⁾ aber, sich zu Gunsten der einen oder der anderen zu erklären.

In dem klassischen System der Bakterien von Migula steht dagegen ausdrücklich, daß der Tetanusbacillus mehrgeißelig sei, es aber seine besonderen Schwierigkeiten habe, dies zu beweisen, da die Geißeln an der Luft verloren gingen.

Auf der anderen Seite haben wir dann das neueste Beispiel Günthers⁶⁾ und das sämtlicher italienischer Autoren, ich zitiere nur z. B. Abba⁷⁾ und Perroncito⁸⁾, deren Lehrbücher in diesem Jahre noch neu aufgelegt wurden und die sämtlich von einer einzigen Geißel reden.

Angesichts einer solchen Meinungsverschiedenheit hielt ich es, wie ich bereits sagte, für angebracht, das Argument wieder aufzunehmen und es genaueren und weitgehenden Prüfungen zu unterziehen.

Schwarz hatte sich bei seinen Experimenten nur der Bouillonkulturen und einer einzigen Färbemethode, der Loefflerschen, bedient, während Kanthacks und Connells Versuche nur auf 4—14tägigen Agarstrichkulturen und der Färbemethode van Ermengems und der weniger bekannten Pitfields basiert waren. Beide arbeiteten nur mit einer Abstammung des Tetanusbacillus.

1) Votteler, Wilhelm, Differentialdiagnose der pathogenen Anaëroben. (Zeitschrift f. Hygiene. 1898. p. 480.)

2) Flügge, Die Mikroorganismen. Leipzig 1896.

3) Miquel, P. et Cambier, R. Paris 1902.

4) Besson, A., Technique microbiologique et sérothérapique. Paris 1902.

5) Lehmann und Neumann. München 1896.

6) Günther, Avviamento allo studio della batteriologia. Torino 1902.

7) Abba, Manuale tecnico di microscopica e bacteriologia. Torino 1902.

8) Perroncito, E., I parassiti dell' uomo e degli animali utili. 1902.

Meine Untersuchungen im hygienischen Institute des Herrn Prof. Dr. Pagliani erfolgten successiv an 2 verschiedenen Stämmen von Tetanusbacillen. Der eine war seit ungefähr 1 Jahre im Institute und kam aus dem Laboratorium von Král, der andere wurde mir freundlichst vom Institut für pathologische Anatomie des Herrn Prof. Dr. Foà überlassen. Ich verwandte bei meinen Versuchen Bouillon- und Agarstrichkulturen, die unter H und in Buchnerschen Röhren entwickelt worden waren. Hiervon bereitete ich in den verschiedenen Entwicklungsperioden 20 Stunden bis 14 Tage alte Präparate — aus Bouillon- und Kulturpatine —; präparierte bis zum 6. Tage von 24 zu 24 Stunden, nachher sprungweise und mit größeren Zeitabständen. Die Beobachtungen wurden methodisch ausgeführt und bezüglich beider Tetanusbacillen verschiedener Abstammung wiederholt.

Um nun von vornherein Präparationsfehler zu vermeiden, bediente ich mich verschiedener Färbemethoden: nämlich derjenigen von Loeffler, Morax und Nicolle, Gino de Rossi und Trenkmann einerseits und der van Ermengemenschen andererseits. Wie bekannt, ist das Verfahren dieses letzten Autors und der übrigen vollständig verschieden, überdies ist in denen von Gino de Rossi, Trenkmann und van Ermengem die Wärmeeinwirkung vollständig ausgeschlossen.

Gleichviel mit welcher Methode, waren die Resultate konstant und für jede Präparatserie vergleichbar, d. h. für alle Präparate, die Kulturen eines bestimmten Alters in einem bestimmten Medium entstammten. Die erhaltenen Bilder wechselten von Methode zu Methode nur hinsichtlich der Klarheit und Deutlichkeit, im übrigen waren sie bis ins Einzelne identisch. In jeder Hinsicht die besten Ergebnisse erhielt ich mit der van Ermengemenschen Methode, die auf der Reduktion der Silbersalze beruht, was der von Golgi zur Färbung der Geißeln verwendeten schwarzen Reaktion entspricht. Sehr gute Resultate gab auch die Moraxsche Methode, wobei bemerkt sei, daß die Zugabe eines Tropfens 1-proz. Schwefelsäurelösung in die Moraxsche Beize ihre Wirkung bedeutend steigerte.

Im Nachstehenden die Resultate:

Der Tetanusbacillus ist bezüglich des Vorhandenseins und der Form der Geißeln sehr verschieden gestaltet, je nach seinem Alter und dem Mittel, in dem er gewachsen ist.

In der ersten Zeit und in seiner vollständigsten Form präsentiert er sich vollständig von Geißeln umlagert, die an Zahl und Feinheit alle die der anderen Mikroorganismen übertreffen. Sie finden sich auf der Längsseite des Mikrobienkörpers und sind $1-1\frac{1}{2}$ mal so lang wie dieser. Gewöhnlich stehen sie perpendikulär zur Achse des Körpers und sind teils leicht gekrümmt und fast gerade, teils gekrümmt mit kurzen und naheliegenden Wellungen und schließlich auch teilweise ausgesprochen spiral (s. Photogr. 1, 2, 3, 4).

Was bei den Präparationen nach den verschiedenen Methoden noch am häufigsten ist, ist das Antreffen von Formen, die weit entfernt sind, ein überzeugendes und klares Bild zu bieten. Gewöhnlich sehen wir die Geißeln unter der Form einer konfusen Masse um den Bacillus herum, die die Färbung und der Metallniederschlag en bloc traf, oder unter Form eines verwirrten Knäuels, der hier und da Verzweigungen zu besitzen scheint (s. Photogr. 5). Angesichts der Anzahl und der Dünne der Geißeln ist dies ja leicht verständlich. In den sorgsam ausgeführten Präparaten bleibt einem aber immer ein Feld, in dem die Bacillen-

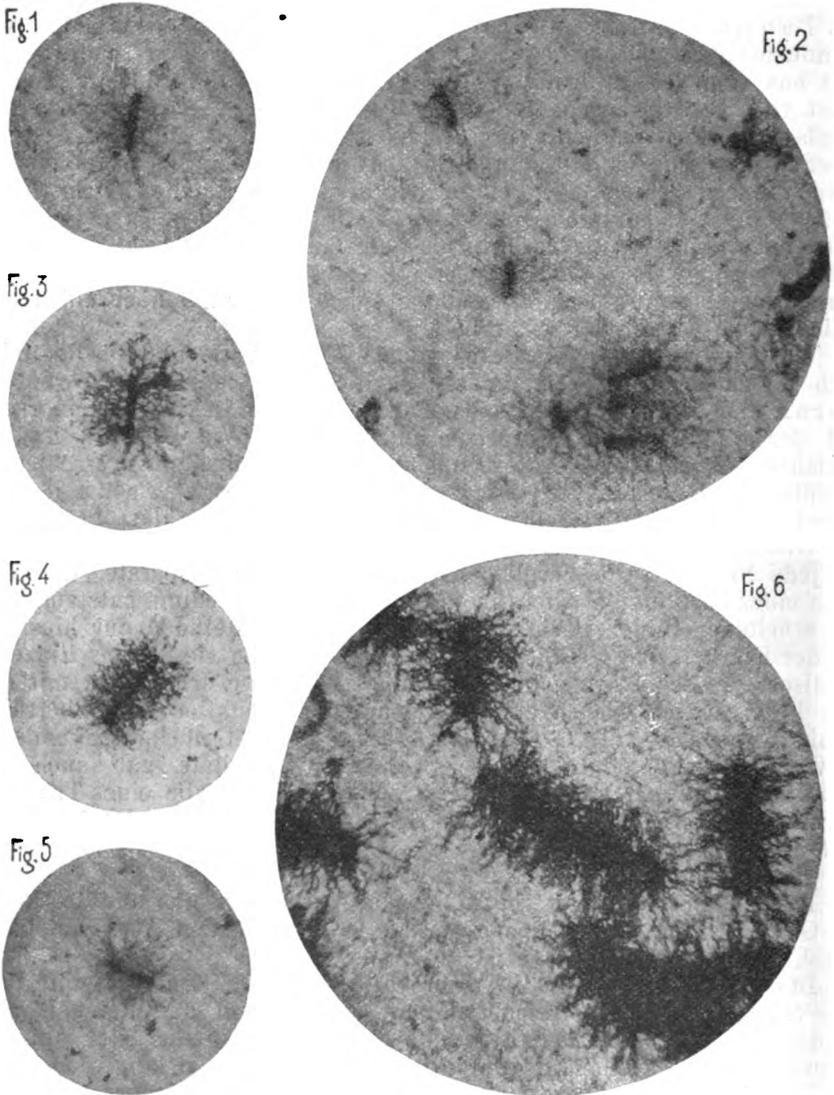


Fig. 1 und 2. *Bac. tet.* mit zahlreichen feinen Geißeln (I. Form). — Isolierte Elemente verschiedener Länge. — Aus 2-tägigen Agarstrichkulturen. — Färbung nach Morax und Nicolle.

Fig. 3. *Bac. tet.* mit Geißeln (I. Form). — Vollständig entwickeltes Element. — Aus 44-stündiger Bouillonkultur (innerhalb Buchnerscher Tuben). — Färbemethode van Ermengem.

Fig. 4. Kurzer, wahrscheinlich aus 2 Elementen zusammengesetzter Faden (Geißeln I. Form). — Aus 44-stündiger Bouillonkultur. — Färbemethode van Ermengem.

Fig. 5. Zwei kurze *Bac. tet.* (Geißeln der I. Form mit anscheinender Verästelung). — Aus 48-stündigen Agarstrichkulturen. — Färbung nach Morax und Nicolle.

Fig. 6. Fäden verschiedener Länge (Geißeln der I. Form). — Aus 20-stündiger Bouillonkultur. — Färbung mit modifizierter van Ermengemischer Methode (sehr starker Niederschlag des Metallsilbers auf den Mikrobenkörper und die Geißeln).

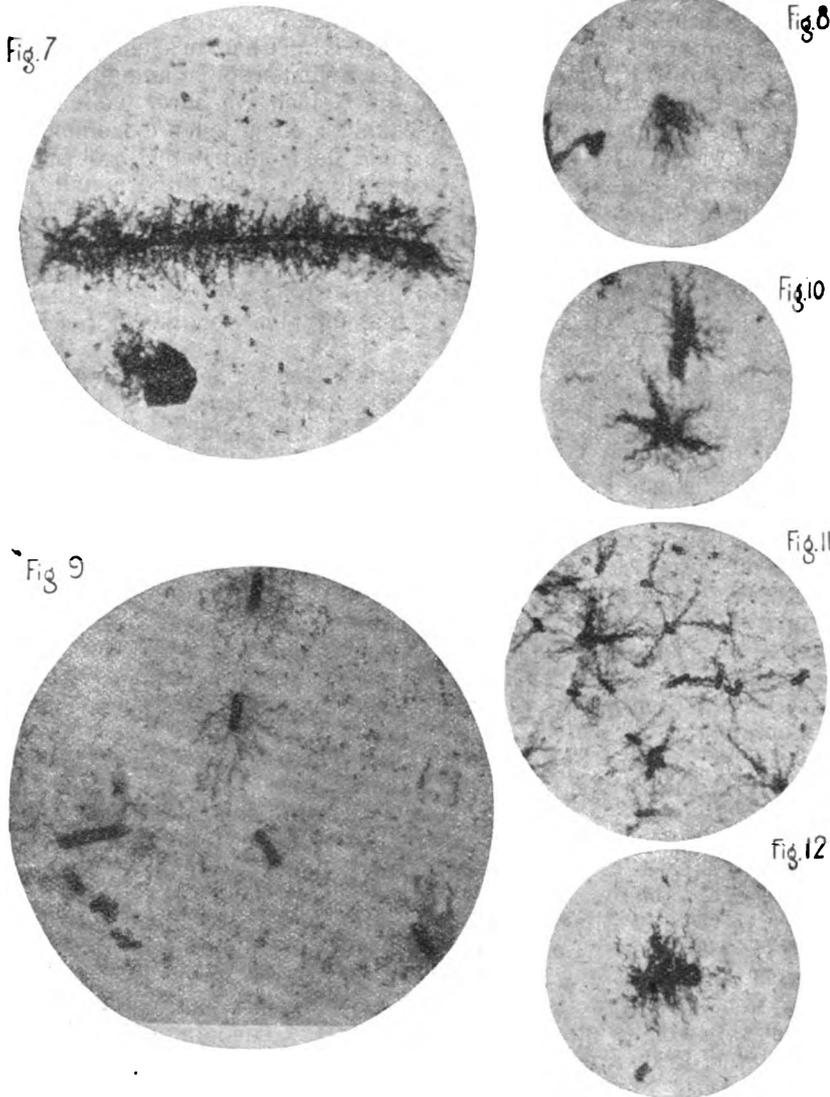


Fig. 7. Langer Faden (Geißeln der I. Form). — 44-stündige Bouillonkultur. — Färbemethode van Ermengem.
 Fig. 8. Bac. tet. mit gelichteten Geißeln (II. Form). — Aus 3-tägiger Agarstrichkultur. — Koloration van Ermengem.
 Fig. 9. Bac. tet. (II. Form). — Einzelne Elemente und rechts kurzes Filament. — Aus 4-tägiger Agarstrichkultur. — Färbung nach Morax und Nicolle.
 Fig. 10. Bac. tet., in dem die Flagellen zu Tage treten (III. Form). — Aus 4-tägiger Agarstrichkultur. — Färbung nach van Ermengem.
 Fig. 11. Bac. tet. mit Flagellen (III. Form). — Aus 4-tägigen Bouillonkulturen. — Färbung nach van Ermengem.
 Fig. 12. Bac. tet. mit beginnender Sporenbildung (Geißeln, die das Uebergangsstadium von der I. zur II. Form zum Ausdruck bringen). — Aus 44-stündigen Bouillonkulturen. — Färbemethode van Ermengem.

formen vollständig ausgestreckte und regelmäßig disponierte Geißeln haben, was ermöglicht, ihrem Laufe zu folgen.

Verwandte ich bei der Methode van Ermengens eine bedeutend stärkere Silbernitratlösung, als solche der Erfinder selbst angiebt (2-proz.), so erhielt ich Präparate, in denen die Geißeln in ihrer vollen Größe erhalten blieben und die Eigentümlichkeiten einer jeden einzelnen wahrzunehmen waren. Es sind dies Formen, bei denen der Mikrobekörper infolge des außergewöhnlichen Niederschlages des Silbermetalles ungemein angewachsen ist, wobei dasselbe, indem es den besagten Körper quasi wie in eine Scheide einhüllt, den Ursprung und das erste Stück der Geißeln verdeckt. Das unbedeckt bleibende Stück der Geißeln tritt infolge seiner außerordentlich intensiven Färbung deutlich individualisiert hervor, ohne Spur von Verzweigung und mit den obengenannten Eigentümlichkeiten (s. Photogr. 6).

Es hält sehr schwer, die Zahl solcher Geißeln festzustellen, besonders da der Tetanusbacillus sehr verschieden lang ist; besonderen Schwierigkeiten begegnet aber eine solche Aufstellung, wenn der Bacillus die oben beschriebene Form angenommen hat, da er sich dann zu kurzen oder langen Fäden vereinigt, in denen die einzelnen Elemente in keiner Weise mehr zu unterscheiden sind. Will man also eine Berechnung anstellen, so begegnet man nicht nur Schwierigkeiten und Irrtümern, die durch die Anzahl und die Dünne der Geißeln bedingt sind, sondern man verfällt auch leicht in den Fehler, sich bei dieser Berechnung insofern zu irren, als man zu diesem Zwecke eine nicht vollständig entwickelte oder eine aus mehreren Elementen zusammengesetzte Form untersucht. — Trotzdem aber glaube ich nicht zu übertreiben, wenn ich einem Tetanusbacillus in voller Entwicklung 50—70 Geißeln zuweise (s. Photogr. 1 u. 3).

In einer zweiten Periode nimmt der Tetanusbacillus bezüglich der Geißeln gradweise, aber rasch ein anderes Aussehen an. Ein Teil derselben trennt sich ab und verliert sich; die übrigen, ungefähr 20—30, werden allmählich dünner, verlängern sich bis zur 2—3fachen Länge des Bacillus, verlieren die erwähnte spirale oder enggebogene Disposition vollständig und bieten vielmehr ein stark gewundenes Aussehen dar (s. Photogr. 7 u. 8). Alles in allem nähert sich der Tetanusbacillus in diesem Moment seiner Form nach dem Typhusbacillus, unterscheidet sich aber von ihm durch die Anzahl und die größere Dünne der Geißeln.

In den diese zweite Form aufweisenden Präparaten finden sich zahllose abgetrennte und im Felde zerstreute Geißeln, die in den gut angefertigten Präparaten der ersten Form fehlen.

Eine dritte Form des Tetanusbacillus wird durch das Erscheinen jener Elemente charakterisiert, die Kanthack und Connell „sekundäre Geißeln“ nannten. Es handelt sich dabei um jene Produkte, die als Ergebnis der Vereinigung verschiedener Geißeln oder der bedeutenden Verdickung einzelner Geißeln erklärt werden und nach Loeffler¹⁾ seit dem Jahre 1900 unter dem Namen „Wimperhaare“ und „Haarzöpfe“ geführt werden, während sich in Italien der Name „Flagellen“ eingebürgert hat, der leider unrechterweise auf alle Geißelprozesse ausgedehnt wurde. Genau wie der Uebergang von der ersten zur zweiten Form, geht auch das Erscheinen solcher Flagellen im Tetanus-

1) Loeffler, Eine neue Methode zum Färben der Mikroorganismen und besonders ihrer Wimperhaare und Geißeln. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. 1899. August.)

bacillus gradweise vor sich. Das Photogr. 10 zeigt, wie in einem Tetanusbacillus der zweiten Gruppe sich Geißelbüschel in 4 Richtungen verteilen und dies derart, daß sie sich schließlich nach erfolgter Verstrickung und Verwirrung zu separaten Elementen ausbilden. Unten und rechts tritt eine dieser schon klar individualisierten Flagellen deutlich hervor. Sie sehen aus wie Fäden, doch sind sie viel dicker und länger als die Geißeln, engspiralförmig, wie verwickelt, steif und haben eine einzige korkzieherartige Richtung. Bei ihrem Erscheinen sind sie zahlreich, niemals aber mehr als 4 pro Bacillus; später nehmen sie in einer Weise an Zahl ab, daß schließlich zu einem gewissen Zeitpunkte die meisten Bacillen nur eine einzige aufweisen. Gleich bei ihrem Erscheinen erfahren die Geißeln eine bedeutende Verminderung, was sich aus ihrem wahrscheinlichen Formationsmodus leicht erklären läßt. Ihr Verschwinden oder das langsame Zerfließen in dickere Flagellen bedeutet das vollständige Verschwinden der Geißeln, so daß man also in den alten Elementen mit einem einzigen Wimperhaar gewöhnlich keine Spuren von Geißeln entdeckt.

In dieser Periode sind die Geißeln vollständig verschwunden, und die Bacillen nahe daran, der Sporenbildung anheimzufallen.

Während nun ein Anfang von Sporenbildung sich nicht nur bei den Flagellenformen zeigen kann, sondern sogar selbst in Uebergangsformen aus der ersten in die zweite Gruppe (s. Photogr. 12), so ist dagegen die vollständige Sporifikation ein Kennzeichen der absolut glatten Formen.

Wir sehen also, daß der Tetanusbacillus in der Periode, die der Sporenbildung vorangeht, mit Geißeln erscheint, die sich, sei es nun durch Verlust oder durch Veränderung der Elemente, modifizieren und uns also gestatten, drei aufeinanderfolgende, genau unterschiedene und unter sich durch Uebergangsformen verbundene Formationen zu erkennen, die da sind:

Eine erste Form mit zahlreichen und feinsten Geißeln an den Längsseiten des Mikrobekörpers.

Eine zweite Form mit gelichteten und nicht so feinen, aber längeren und gewundenen Geißeln.

Eine dritte Form mit langen, verschlungenen, steif aussehenden Flagellen (Wimperhaaren) und immer spärlicheren Geißeln.

Die erste Form beobachtet man in den Kulturen innerhalb der Buchnerschen Röhren bis zum 2. Tage in Bouillon und bis zum 3. im Agarausstrich. Gerade wie es nun zu einer Seltenheit gehört, diese Form auch später zu finden, ist es auch äußerst selten, in der ersten Periode Formen der anderen Gruppen zu begegnen. Von der ersten Periode an schließen sich die anderen Formen direkt an, in einer Weise aber, daß man folgende Perioden unterscheiden kann, in denen die einzelnen Formen vorherrschen. So z. B. sind am 3. Tage in Bouillon und am 4. Tage in Agar die Formen mit gewundenen Geißeln vorherrschend, während am 4. Tage in Bouillon und am 5. und 6. Tage in Agar die Formen mit großen Flagellen fast exklusiv sind. Danach erhält man nur noch Bacillen, die immer schwächer und schwächer mit Geißelprozessen besetzt sind, so daß am 10. Tage in den beiden Kulturböden nur noch einige Elemente eine oder mehrere Flagellen oder ein Büschel kurzer und undeutlicher Geißeln aufweisen.

Die Zeitdifferenz, welche sich zwischen den beiden Befunden der in den zwei Böden befindlichen Kulturen ergeben hat, scheint mir wohl dem

Umstände zugeschrieben werden zu müssen, daß bei den Bouillonkulturen der anaërobische Zustand eher und vollständiger erreicht wird. In der Tat bemerkte ich nun auch, daß die angeführte Differenz verschwand, sobald ich die Agarausstrichkulturen in den Buchnerschen Röhren vor Einsetzung in den Brutapparat 24 Stunden lang im Kühlen hielt, derart, daß der Sauerstoff in gebührender Weise in dem Moment absorbiert wurde, in welchem die Entwicklung der Kultur begann. Außerdem fand ich, sobald ich die Kulturen in Bouillon unter H, anstatt in den Buchnerschen Röhren, entwickelte, daß in ihnen schon nach 40 Stunden die Flagellenformen in großer Zahl existierten, die, wie ich schon sagte, in den in Buchnerschen Röhren stehenden Kulturen erst am 3. Tage erscheinen und nicht früher als am 4. Tage vorherrschen.

Die exklusive Gegenwart der Formen mit zahlreichen Geißeln in den ersten Tagen, das Vorherrschen der anderen in den nachfolgenden Perioden der Kulturentwicklung, der zu Tage getretene Zusammenhang zwischen dem Erscheinen solcher Formen und der Beschleunigung oder Verspätung in der kulturellen Entwicklung machen es klar, daß es sich hier nicht um verschiedene Formen handelt, die der Tetanusbacillus ohne Unterschied annehmen kann (wie dies Votteler glaubte), sondern um wirkliche, aufeinander folgende Entwicklungsstadien (wahrscheinlich involutive), von denen das erste auch zeitlich genau unterschieden ist, während die übrigen zu rasch aufeinander folgen und wahrscheinlich in ungleicher Weise bei den einzelnen Bacillenelementen.

Diesem scheint aber die bekannte Tatsache zu widersprechen, daß nämlich in den Kulturen schon nach 36 oder 48 Stunden (unter H) sporige Formen auftreten, welche also in dieser kurzen Zeit die ganze vorbeschriebene involutive Entwicklung hätten durchmachen müssen. Abgesehen aber ganz davon, daß es mir gar nicht so schwer ankommt, zu glauben, daß einige Elemente den anderen gegenüber eine raschere Entwicklung aufweisen könnten, muß ich noch erwähnen, daß fast alle von mir in dieser Periode beobachteten sogenannten gesporteten Bacillen weit davon entfernt waren, das wahre Aussehen der resistenten Form des Tetanusbacillus zu bieten. Es handelt sich um Stäbchen, die fast immer länger als gewöhnlich sind und gegen das eine Ende zu eine keilförmige, nicht stark hervortretende Schwellung zeigen, mit einem stärker lichtbrechenden Punkt. Jenseits dieser Schwellung ist häufig noch das letzte glatt abgeschnittene Ende des Bacillus sichtbar. Diese Formen mit einfachen Anzeichen von Sporenbildung folgen, wie ich schon erwähnte, bezüglich der Geißeln der Evolution der anderen Bacillen (Photogr. 12).

Die Beobachtungen von Kanthack und Connell bleiben im wesentlichen bestätigt, werden teilweise aber erweitert und in einigen Einzelheiten modifiziert.

Der Tetanusbacillus ist wirklich vielgeißelig und zeigt sich in den nachfolgenden Perioden unter den von ihnen beschriebenen Formen; doch sind diese Formen nicht die einzigen, noch sind sie in allen Einzelheiten genau zur Geltung gebracht.

Die erste, wahre und vollständige Form des gezeißelten Tetanusbacillus mußte notwendigerweise den beiden zitierten Autoren entgehen, die 4- und mehrtägige Agarstrichkulturen verwandten. Tatsächlich existiert in ihrer Arbeit keine diesbezügliche Andeutung, und die von ihnen als vollständig erachtete Form entspricht hinsichtlich Beschreibung

und Photogramm gänzlich derjenigen, die ich die Form mit gelichteten Geißeln nannte.

Da sie nun aber ihre Beobachtungen auf Kulturen in einem einzigen Nährboden ausgeführt hatten, welche ziemlich fernliegenden Entwicklungsperioden (4 und 14 Tage) angehörten, so erlaubte gerade dieser Umstand ihnen nicht, mit der gebührenden Sicherheit¹⁾ das zeitliche Aufeinanderfolgen der verschiedenen Formen darzulegen und um so weniger die Perioden der kulturellen Entwicklung zu präzisieren, die sie durchmachen.

Wenn sie dann behaupten, daß die Fäden weiter auseinander stehende und feinere Geißeln haben als die isolierten Bacillen, so verfallen sie einer Ungenauigkeit. Die Photogramme 4, 6, 7 zeigen für die erste Form und das Photogramm 9 für die zweite deutlich, daß die Fäden den ihnen eigenen kulturellen Entwicklungseigentümlichkeiten entsprechen.

Auch scheint mir ihre Vermutung, daß einige Formen der Flagellenbildung entgehen, indem sie aus der für sie vollständigen Form mit gelichteten Geißeln in die gesportete, glatte übergehen, nicht bestätigt; eine Vermutung, die sie für berechtigt hielten, weil sie Bacillen mit Anzeichen von Sporenbildung angetroffen hatten, die nur von dünnen Geißeln besetzt waren. Ich für meinen Teil habe gefunden, wie ich wiederhole, daß solche Formen die gewöhnliche Straße wandeln und zur bestimmten Zeit auch Flagellen aufweisen.

Dagegen habe ich keine Elemente gehabt, die es mir gestattet hätten, ihre Beobachtungen zu bestätigen oder zu bekämpfen, die sie auf der Basis von mit der van Ermengem'schen Methode erhaltenen Befunden (die auch ich sehr oft anwandte) gemacht hatten, nach welchen Befunden es vollständig klar wäre, daß der Tetanusbacillus von einer von den Geißeln perforierten Kapsel umgeben ist, welche eine direkte Dependenz des Protoplasmas der Bakterienzellen darstellt.

Votteler, der offenbar seine Nachforschungen angestellt hat, ohne die Arbeit von Kanthack und Connell zu kennen, und überdies keine systematischen Beobachtungen ausführte, gibt uns ziemlich unvollständige Beschreibungen. Aus ihnen und besser noch aus seinen Photogrammen entnehmen wir, daß es ihm gelungen ist, die erste Form mit zahlreichen — dichten — Geißeln und die zweite mit stark gelichteten Geißeln zu beschreiben, aber nicht die dritte mit Geißeln. Außerdem kam er zu dem Schlusse, daß man bezüglich derselben an einen Polymorphismus des Tetanusbacillus glauben müsse, womit er es also unterließ, den Zusammenhang hervorzuheben, der zwischen den einzelnen Formen existiert.

Die Resultate von Schwarz kann man nicht dadurch erklären, daß man einfach annimmt (wie dies Kanthack tut), daß er auf einflagellige Formen geraten sei, und auch nicht, indem man einfach behauptet — wie dies Votteler sich gestattet — daß die von ihm verwandte Färbemethode ungenügend sei; eher schon, wenn man beide Punkte zusammenfaßt. Schwarz gebrauchte in der Tat 2-tägige Bouillonkulturen unter H. Unter solchen Verhältnissen kann der Tetanusbacillus wohl Flagellen aufweisen, aber immer auch Geißeln, die

1) Kanthack and Connell, loc. cit. p. 454: „so far as we are able to judge, the youngest forms possess only the thin, primary processes: subsequently thicker ones appear It seems that the primary flagella are the first to disappear“

eine gute Färbemethode ans Tageslicht gefördert hätte. Nun steht es aber außer Frage, daß die Loefflersche Methode in der Gestalt, wie sie von Schwarz angewandt wurde, d. h. mit dem Zusatz von Natriumhydrat zur Beize, zur Färbung der äußerst feinen Geißeln des Tetanusbacillus durchaus nicht geeignet ist. Die Kulturen dieses Bacillus haben eine scharfe alkalische Reaktion, und da ist es natürlich, daran zu denken, daß die Beizung der Bacillenelemente dann stärker eintritt, wenn die Beize saure Reaktion besitzt. Ich habe auch bereits darauf hingewiesen, daß der Zusatz von H_2SO_4 zur Moraxschen Beize (die auch die Loefflersche ist) die Einwirkung stark fördert. Schwarz befand sich somit in ungünstigeren Beobachtungsverhältnissen, und das wird wohl der Grund gewesen sein, weshalb es ihm nur gelang, einige der großen Flagellen des Tetanusbacillus zu färben, nie aber die dünnen Geißeln.

Angebracht scheint es mir auch, einige Worte über die Präparations-technik vorzubringen, nicht nur weil in dieser Hinsicht ein Satz Migulas (in Migulas System der Bakterien) „viele Geißeln, peritrich geordnet, aber nicht sichtbar, da sie, wie es scheint, an der Luft abgeworfen werden . . .“ ins Auge fällt, mit anderen Worten gesagt, daß es fast unmöglich ist, die Geißeln des Tetanusbacillus nachzuweisen, sondern auch, weil mir einige im Laufe meiner Untersuchungen gemachte technische Erfahrungen bemerkenswert zu sein scheinen.

Vor allem kann ich hier nicht umhin, den Resultaten Migulas gegenüber zu bemerken, daß der Nachweis der Tetanusgeißeln keine größeren Schwierigkeiten hat als der anderer, und daß ich konstatieren konnte, daß man auch aus Material, das bis zu 3 Tagen im Wasser und an der freien Luft suspendiert war, noch sehr gute Resultate zu erhalten vermochte.

Alle von mir streng nach Angabe der Erfinder gehandhabten Methoden gaben zum mindesten gute Resultate.

Eine wichtige Rolle schien mir die Vorsorge zu spielen, mit der das Material, auf dem Deckgläschen gesammelt, ausgebreitet wird. Es kann nie genug wiederholt werden, daß die Verdünnung der Kulturpatine oder des Bouillontropfens mit der größten Geschicklichkeit und in den nötigen Proportionen ausgeführt werden soll, da man im fertigen Präparate nur wenige und isolierte Formen haben muß, daß ferner das Deckgläschen vollständig rein gehalten werde, derart, daß der Flüssigkeitstropfen sich über seine ganze Oberfläche gleichmäßig verteilt und die Eintrocknung des Materials langsam an der Luft oder im Brütkasten vor sich geht, und daß schließlich die Fixation mittels der Flamme vermieden werden muß.

Eine besondere Berücksichtigung verdient die Präparationstechnik der Bouillonkulturen. Allerseits wurde darüber geklagt, daß solche Präparationen schlechte Resultate ergeben, und zwar wegen der albuminoiden Substanz, welche nötigerweise die Bacillen begleitet und deren Form entstellt, indem sie sich auf sie und um sie herum niederschlägt und färbt. Ich dagegen habe festzustellen vermocht, daß dies in keiner Weise der wirklichen Tatsache entspricht, oder wenigstens, daß wir zur fast vollständigen Vermeidung des vorgenannten Uebelstandes ein ganz einfaches und sicherlich nicht nur beim Tetanusbacillus verwendbares Mittel besitzen. Den Beweis hierfür erbringen die Photogramme 3, 4, 6, 7, 11, 12, welche Bouillonkulturpräparaten entstammen, die aller-

dings keinen sauberen Grund haben, in denen aber trotzdem die Beobachtung der Elemente mir nicht im geringsten gestört erschien, wenn gleich weder an den Elementen noch am Grunde die geringste Retouche vorgenommen worden ist. Um dies zu erreichen, genügt es, daß der zur Beobachtung verwandte Kulturtröpfen so reich an Bacillen ist, daß er eine ziemlich starke Verdünnung gestattet. Nach solchem Vorgehen wird man im Präparate eine nicht zu spärliche Anzahl von Bacillenformen und äußerst geringes albuminoides Material haben. Kulturen, die solches Material liefern, werden wir erhalten, wenn wir besonders zwei Punkte beachten, d. h. dieselben ausgiebig einsäen und sie unter den besten Verhältnissen (entsprechende Bouillonreaktion, Temperaturoptimum etc.) sich entwickeln lassen.

Im Verlaufe dieser Beobachtungen habe ich nicht verfehlt, von jeder Kultur solche Präparate im hängenden Tropfen zuzubereiten, die im stande waren, die Bewegungsfähigkeit des Tetanusbacillus darzutun. Wie bekannt, wird allgemein angenommen, daß derselbe nur wenig beweglich ist; einige Autoren (z. B. Vasseler) gehen sogar so weit, diese Bewegungsfähigkeit fast auf ein Nichts zu reduzieren. Aus meinen Beobachtungen hingegen geht hervor, daß die meisten Tetanusbacillen, abgesehen von der Molekularbewegung, vollständig immobil sind, auch in nicht gesportem Zustande, daß einige wenige Formen eine langsame und unbedeutende Bewegung haben, nämlich den Lagewechsel eines ihrer Enden und eine leichte seitliche Oscillation, und daß es schließlich nur ganz ausnahmsweise möglich ist, einige gewöhnliche kurze Formen anzutreffen, die mit wirklicher Translations-Bewegungsfähigkeit ausgestattet sind.

Angesichts der großen Anzahl von Geißeln, die als Bewegungsorgane angesehen werden, und ihres Bestehens auch in Zeitperioden, in denen die anderen Bakterien solche nicht mehr aufweisen, stößt eine Erklärung auf nicht unbedeutende Schwierigkeiten.

Es kam mir der Gedanke, daß diese Tatsache von den Beobachtungsbedingungen abhängen könne. Ich wechselte also Natur und Reaktion des Suspensionsliquids, sowie Temperatur, aber ohne Resultat. Daraufhin entschloß ich mich, meine Zuflucht zur Beobachtung und Kultur im hängenden Tropfen im anaëroben Zustande zu nehmen. Es ist bekannt, daß andere Anaëroben und absolute Anaëroben sich unter den gewöhnlichen aëroben Beobachtungsverhältnissen im hängenden Tropfen für einige Zeit mobil zeigen; deshalb mußte ich selbstverständlich den Erfolg bezweifeln. Doch versuchte ich es angesichts der von Kanthack-Connell geäußerten Ansicht¹⁾, daß nämlich ein Apparat, der die Beobachtung im hängenden Tropfen unter anaëroben Verhältnissen gestatten würde, wahrscheinlich die Beweglichkeit des Tetanusbacillus dartun könnte.

Die gewöhnlichen Versuche bezüglich Absorbierung des Sauerstoffs vermittlest Natriumpyrogallsäure erwiesen sich sofort als ungenügend; Aëroben und Anaëroben verhalten sich dabei fast ganz wie in den gewöhnlichen Objekträgern, weil in ihnen die Absorbierung des Sauerstoffs langsam, gradweise und niemals vollständig ist.

Ich habe darum die Probe mit einer kleinen Zelle wiederholt und

1) loc. cit.

meine Beobachtungen dabei in Wasserstoffatmosphäre angestellt, die meiner Ansicht nach vollständig zweckentsprechend ist und von mir in der Rivista d'Igiene. 1902 beschrieben wurde. Ich habe da tagelang die Entwicklung und die Multiplikation der in den Bouillontropfen eingesäten Tetanuskeime bis zur Sporenbildung verfolgt und konnte niemals eine Vermehrung ihrer Beweglichkeit konstatieren.

Die Tatsache bleibt also sonderbar und schwierig zu erklären, wenn gleich nicht allein dastehend. Es scheint in der Tat, daß unter den nicht pathogenen Bakterien einige Geißeln sich mit geringem oder keinem Bewegungsvermögen ausgestattet erweisen (Klein). Das kann aber doch die allgemeine Ansicht nicht entkräften, daß nämlich die Geißeln Bewegungsorgane seien, verdiente aber meines Erachtens immerhin zur allgemeinen Kenntnis gebracht zu werden, und zwar nicht zum wenigsten, weil es einen logischerweise auf den Gedanken bringen kann, daß in bestimmten Bakterien die Geißeln ihre Funktion ganz oder teilweise verloren haben, und schließlich dertut, wenn dies erforderlich wäre, daß die Anzahl der Geißeln nicht die geringste Beziehung hat zur Bewegungsstärke.

Ich betrachte es zum Schlusse als einen Akt dankbarer Pflichterfüllung, wenn ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Pagliani und seinem Assistenten, Herrn Prof. Dr. Batarelli, für die mir im Laufe meiner Arbeit erteilten Ratschläge und Hilfeleistungen meinen besten Dank abstatte.

Nachdruck verboten.

Ueber eine bewimperte Micrococcusform, welche in einer Septikämie der Kaninchen gefunden wurde.

Von **G. Catterina**, Priv.-Doz. für Bakteriologie an der kgl. Universität Padua.

Mit 4 Figuren.

Mehrere Jahre sind seit den ersten Befunden von verschiedenen pathogenen Formen, welche Septikämien bei Kaninchen erregen, bereits verstrichen. 1872 impfte Davaine¹⁾ in Fäulnis übergegangenes Rinderblut den genannten Tieren ein und erhielt eine Septikämie, welche auch Koch²⁾ 6 Jahre später nach Inokulation von Saft faulenden Fleisches bei denselben Objekten hervorzurufen vermochte. Das rings um die Impfstelle sich bildende Oedem sowie das Blut enthielten Haufen von eiförmigen Mikrokokken, welche im stande waren, die Krankheit auf andere Kaninchen und auf Mäuse zu übertragen; der von den genannten Autoren bei beiden Tierarten beobachtete klinische Zustand stimmte vollkommen mit jenem überein, den man erhält, wenn man den *Micrococcus cholerae gallinarum* diesen Tieren einimpft.

Eine weitere Septikämie, welche in ihren Wirkungen der oben erwähnten sehr ähnlich ist, erhielt Darenberg³⁾, als er Tuberkelprodukte einigen Kaninchen einimpfte. Diese Septikämie von epidemischem Charakter war einem eiförmigen *Micrococcus* zuzuschreiben, der haufenweise

1) Davaine, Recherches sur quelques questions relatives à la septicémie. (Bullet. de l'Acad. de méd. 1872.)

2) Koch, Ueber die Aetiologie der Wundinfektionskrankheiten. Leipzig 1878.

3) Darenberg, Note sur une septicémie du lapin. (Soc. de biol. 1886. p. 457.)

oder auch zu Ketten aneinandergereiht auftritt, Gelatine nicht verflüssigt und einer Temperatur von 55° C, ohne seine Virulenz einzubüßen, recht gut zu widerstehen vermag.

Eine spontane Kaninchenseptikämie wurde im Jahre 1887 von Smith¹⁾ und eine andere 1888 von Thoinot und Masselin²⁾ studiert; beide waren von dem gleichen Mikroorganismus hervorgerufen, dessen Wirkungsweise jener des oben genannten *Micrococcus cholerae gallinarum* sehr ähnlich ist.

Im Jahre 1888 beschrieben Eberth und Schimmelbusch³⁾ eine Septikämie bei Wieseln und wilden Kaninchen, die ähnlich den von den früheren Autoren beobachteten war und gleichfalls von einem eiförmigen *Micrococcus* hervorgerufen war, der bei Hühnern nicht pathogen ist. Endlich wurde das Jahr darauf von Lucet⁴⁾ eine Septikämie beobachtet, welche, den früheren ähnlich, ebenfalls von einem *Micrococcus* bedingt war, der bald einzeln, bald paarweise auftreten kann und Gram widersteht. 1890 studierte Eberth selbst mit Maudry⁵⁾ eine Kaninchenseptikämie, die mit jener oben erwähnten von Smith und von Thoinot und Masselin beobachteten vollkommen identisch war.

Im Dezember vorigen Jahres bot sich nun auch mir Gelegenheit, eine Kaninchenseptikämie zu studieren, deren besondere Merkmale, namentlich was den pathogenen Erreger betrifft, mir einer Mitteilung wert erscheinen. Damals wurden mir zu wiederholten Malen tote Kaninchen gebracht, bei welchen ich folgende pathologisch-anatomische Verletzungen vorfand: Hypertrophie und Schwarzfärbung der Milz; reichliches Coagulum in den Herzhöhlen und braune Färbung des Blutes. Die Parenchymgewebe aller untersuchten Organe und das Blut zeigten unter dem Mikroskope reichliche Mengen von Mikrokokken, welche vorwiegend isoliert auftraten.

Bei den Kulturen, welche mit dem den verschiedensten Organen entnommenen Material angestellt wurden, erhielt ich die Entwicklung des bereits in den toten Kaninchen beobachteten *Micrococcus*. Die verschiedenen Kulturmerkmale lassen sich nachstehend zusammenfassen:

Die durch Einstich in Gelatine vorgenommenen Kulturen sind charakteristisch; schon nach 3 Tagen erschienen bei 22° C längs der von der Nadel durchsetzten Strecke ganz winzige, zu dieser mehr oder weniger schräg gestellte Fäden, die stärker in den tieferen Schichten des Substrates entwickelt waren. Die weißliche Kolonie an der Oberfläche erschien unregelmäßig warzig und ihre Mitte erhob sich über die Gelatinefläche, welche niemals verflüssigt. Auf Gelatineplatten bekommt man bei 22° C binnen 3—5 Tagen eine Entwicklung von Kolonien sowohl in den oberflächlichen als auch in den tieferen Schichten; dieselben sind unregelmäßig, amöboid; von ihrer Peripherie gehen zahl-

1) Smith, Th., A contribution to the study of the microbe of rabbit septicoemia. (The Journ. of comp. med. T. VIII. 1887. p. 24.)

2) Thoinot et Masselin, Septicoemie spontanée des lapins. (Précis de microbiologie. Ed. II. 1894. p. 402.)

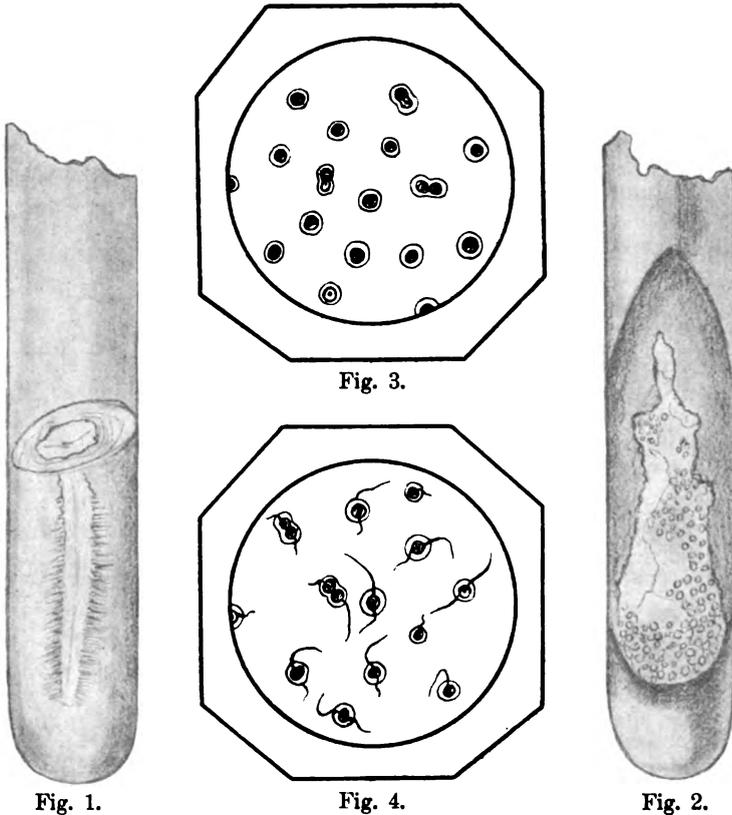
3) Eberth und Schimmelbusch, Fortschr. d. Med. Bd. VI. 1888. p. 295, und Virchows Archiv. Bd. CXVI. 1889. p. 327.

4) Lucet, Sur une nouvelle septicoemie du lapin. (Annal. de l'Institut. Pasteur. 1889. No. 8.)

5) Eberth und Mandry, Die spontane Kaninchenseptikämie. (Fortschr. d. Med. Bd. VIII. 1890.)

reiche kurze Fädchen aus. Die Oberflächenkolonien erheben sich mit dem Zentrum des Nährsubstrates und wachsen auch rascher.

Eine Aussäung auf Agaragar gibt bei 37° C schon nach 24 Stunden isolierte Kolonien, welche eine ausgesprochener weißliche Farbe besitzen als die Gelatinekolonien; sie sind unregelmäßig, außerordentlich klein und erheben sich mehr oder weniger über die freie Fläche des Substrates.



- Fig. 1. Gelatinekultur nach 3 Tagen, bei 22° C.
 „ 2. Gelosekultur nach 24 Stunden, bei 37° C.
 „ 3. Färbung mit Löfflers Reagens (Oc. 4, Obj. $\frac{1}{12}$ Im. hom. eines C. Reichert-
 schen Mikroskopes).
 „ 4. Färbung mit den Lösungen von Nicolle und Morax (Oc. 4, Obj. $\frac{1}{12}$,
 Im. hom., Mikr. Reichert).

In peptonisierter Brühe werden bei 37° C kleine Flocken gebildet, während die Nährlösung ungetrüb bleibt; die Flocken sind sehr zart, so daß dieselben beim Schütteln der Flüssigkeit darin sich gewissermaßen auflösen scheinen und die Brühe trüben, indem sie ihr die ihnen eigene Farbe verleihen. In der Brühe selbst wurde nie die geringste Bildung eines Oberflächenhäutchens wahrgenommen.

In geronnenem Blutserum, mit oder ohne Glycerinzusatz, erhält man bei 37° C nach 24 Stunden die gleichen Kulturerfolge wie bei Agarkulturen; auf Kartoffeln hat man hingegen eine Entwicklung von un-

regelmäßigen, am Rande gelappten Kolonien von der gleichen weißlichen Farbe wie auf den übrigen Nährböden.

Die Entwicklung geht auch in der Milch recht gut vor sich, wenn auch die letztere sich makroskopisch nicht im geringsten zu ändern scheint, selbst wenn sie tagelang bei einer Temperatur von 37° C belassen wird.

Die Indolprüfung fiel negativ aus.

Bei anaëroben Kulturen wird die Entwicklung, besonders in den ersten Kolonien, einigermaßen verzögert.

Dieser Micrococcus färbt sich mit den gewöhnlichen Färbungsmitteln gut und widersteht Gram.

Er tritt fast immer isoliert auf, hat einen Durchmesser von 1,5 μ und nur selten sind Diplokokkenformen an ihm zu beobachten.

Seinen inneren Bau betreffend, läßt sich ein zentraler, stärker gefärbter Teil ganz deutlich wahrnehmen, und wenn der Mikroorganismus in Vermehrung begriffen ist, dann streckt sich der zentrale Teil und nimmt die Gestalt eines kleinen Stäbchens an.

Rings um den zentralen Teil findet sich ein Hof, der sich weniger intensiv färbt und von einer Membran oder Cuticula begrenzt wird, rings um welcher wiederum ein zweiter Hof bemerkbar wird, der sich aber nicht färben läßt.

Nach dem Verhalten dieses zentralen Teiles sowohl den Tinktionen gegenüber, als auch betreffs der Form, die er bei der Vermehrung annimmt, glaube ich, daß derselbe als Zellkern anzusprechen sei.

Bei der Beobachtung im hängenden Tropfen nimmt man eine lebhaft eigene Bewegung an ihm wahr; welcher Umstand meine Aufmerksamkeit desto mehr auf sich zog, als ich gleich anfangs vermutete, daß jene Bewegung von flimmernden Wimpern bedingt wäre, während bis jetzt bekanntermaßen nur bei sehr wenigen Mikrokokken derartige Organe wieder gefunden wurden.

Der erste diesbezügliche Mikroorganismus wurde im Jahre 1889 von Ali Cohen¹⁾ beschrieben, der ihn aus dem Trinkwasser isolierte und Micrococcus agilis benannte. An demselben fand der genannte Autor normal nur einen Wimperfortsatz, während Löffler später ihrer mehrere an dem nämlichen Mikroorganismus beobachtete. Nachträglich beobachtete Löffler²⁾ einen anderen mit Bewegungsvermögen ausgestatteten Micrococcus, den er auch kultivierte und beschrieb; einen dritten fand Menge³⁾ und nannte ihn Micrococcus agilis citreus.

Mit Anwendung der gewöhnlichen eigenen Wimper-Tinktionsmethoden gelang es mir, an der beschriebenen Micrococcusart 2 Wimpern, die an zwei entgegengesetzten Stellen vorkommen, ersichtlich zu machen.

Was die Natur der Wimpern betrifft, so glaube ich nicht, daß dieselben einfache Fortsetzungen der den Mikroorganismus umhüllenden Membran sind, sondern ich glaube, daß sie als Fortsätze des Zellprotoplasmas angesehen werden müssen. Denn eine genaue Beobachtung lehrt, daß die eigentliche Membran sich am Grunde der Wimper unterbricht, ja sogar auf diese zurückfaltet und sie kappenartig umhüllt. Dieses Bewegungsorgan dürfte somit, meiner Meinung nach, aus zwei wohl geschiedenen Teilen bestehen, nämlich aus Protoplasma als Ausfluß des

1) Ali Cohen, Centralbl. f. Bakteriol. Bd. VI. 1889. p. 33.

2) Löffler, Ibid. Bd. VI. 1889. p. 219 und Bd. VII. 1890. p. 634—637.

3) Menge, Ibid. Bd. XII. 1892. No. 2—3.

Zellprotoplasmas, und dieser Teil würde die eigentliche Wimper bilden, und aus jenem erwähnten kutikularen, kappenartigen Ueberzuge.

Wenn man etwas von den Kulturobjekten mit einer Platinöse Kaninchen unter die Oberhaut bringt, so sterben die Tiere nach ca. 48 Stunden unter den krankhaften Erscheinungen von Haarsträuben, Anorexie und allgemeiner Erstarrung.

Der autoptische Befund weist an der Impfstelle keinerlei Veränderungen auf; die Milz ist hypertrophisch und schwärzlich gefärbt, braunes Coagulum liegt in den Herzkammern, das Blut ist gleichfalls braun; ganz derselbe Befund wie bei den Kaninchen, die man mir gebracht und in denen ich den in Rede stehenden *Micrococcus* gefunden hatte.

Im Blute kommt dieser Mikroorganismus in reichlichen Mengen, isoliert und nur selten gepaart, vor.

Meerschweinchen und Mäuse sterben binnen 40—60 Stunden unter denselben Erscheinungen, die man an den inokulierten Kaninchen beobachten kann.

Bei Hühnern erhält man keine pathologische Erscheinung, selbst dann nicht, wenn 0,5 cm von Bouillonkulturen denselben eingeimpft wurden.

Die Wirkungsweise des *Micrococcus* bleibt in Kulturen durch ungefähr Monatsdauer erhalten.

Die in Bouillon zur Entwicklung gelangten und durch 15 Tage bei 37° C gehaltenen, nachher mit Chamberlands Filter filtrierten Kulturen wurden in einer steigenden Menge, von 2—20 ccm der filtrierten Brühe, 5 Kaninchen inokuliert und ich erhielt damit innerhalb eines Monats gewissermaßen eine Vaccination, so daß 2 derselben einer Impfung mit dem Virus *micrococcus* widerstanden, das 3. starb während des Experimentes nach 20 Tagen und die übrigen erlagen 3 Tage nach der Impfung des virulenten *Micrococcus*, obwohl dieselben ganz so behandelt worden waren, wie die beiden überlebenden.

Aus den vorgelegten Beobachtungen glaube ich nun schließen zu können:

1) Der von mir isolierte *Micrococcus* ruft bei Kaninchen, Meerschweinchen und weißen Mäusen eine echte Septikämie hervor.

2) Kraft seiner Eigenschaften ist dieser *Micrococcus* als eine von den bisher bekannten verschiedene Art anzusehen und ich werde ihn *Micrococcus agilis albus* benennen.

3) Die Filtrate der Kulturprodukte dieses *Micrococcus* verleihen in gewissen Fällen den Kaninchen eine Immunität gegenüber dem virulenten *Micrococcus*.

Nachdruck verboten.

Ein Beitrag zur pathologischen Anatomie des Paratyphus.

[Aus Prof. Chiaris pathol.-anatom. Institute an der deutschen Universität in Prag.]

Von Dr. Franz Lucksch, I. Assistenten am Institute.

Bei der in diesem Winter in Prag aufgetretenen größeren Epidemie von Typhus abdominalis hatten wir öfters Gelegenheit, solche Fälle in unserem Institute zu obduzieren. Die anatomischen Befunde waren dabei im allgemeinen die gewöhnlichen. Am 29. Dezember 1902 kam wieder ein Fall zur Sektion, der dabei gemachte Befund war jedoch ein so verschiedener von dem, was wir in solchen Fällen zu finden gewohnt sind, daß ich nach der Sektion den Herren Klinikern gegenüber erklären mußte, daß es sich hier wahrscheinlich nicht um einen Typhus abdominalis handeln dürfte. Die, wie in jedem Falle, so auch hier, vorgenommene bakteriologische Untersuchung ergab weitere Anhaltspunkte dafür und führte schließlich zu dem Resultate, daß es sich im vorliegenden Falle um eine Infektion mit einem Paratyphusbacillus handle. Da die durch diese Bacillen hervorgerufenen Erkrankungen gewöhnlich leichter Natur sind und selten zum Tode führen, ist es begreiflich, daß wir über die anatomischen Veränderungen, welche sich im Verlaufe dieser Infektionskrankheit bilden, noch sehr wenig wissen. Es liegen bis jetzt erst drei Obduktionsbefunde vor, der von Longcope, Sion und Negel und der von R. Schmidt. Ich glaube daher, den von mir beobachteten Fall zur weiteren Kenntnis bringen zu müssen, um so einen Beitrag zur pathologischen Anatomie dieser Erkrankung zu liefern. Ich will zunächst das Wichtigste aus der Krankengeschichte, sodann das Sektionsprotokoll und die sich daran anschließende bakteriologische und histologische Untersuchung des Falles bringen.

Aus der **Krankengeschichte**, die ich der Liebenswürdigkeit des Herrn Hofrats Prof. Dr. Pšibram verdanke, wäre anzuführen:

Anamnese (24. Dezember 1902):

Patient, 25 Jahre alt, wird in bewußtlosem Zustande eingebracht. Sein Begleiter gibt an, daß derselbe vor einer Woche unter Mattigkeit, Abgeschlagenheit und Schwäche erkrankt sei; er habe kein Flußwasser getrunken, sondern Sodawasser; der Stuhl war in letzter Zeit diarrhoisch; seit 4 Tagen lag er zu Bette, seit 2 Tagen war er bewußtlos.

Status: Conjunctiva des rechten Auges gerötet. Das Gesicht bläulich. Lippen trocken, mit gelben Borken bedeckt. Zunge ebenfalls trocken, braunschwarz. Mund wird offen gehalten. Patient atmet ziemlich oberflächlich. Ueber den Lungen überall Pfeifen und Giemen. Abdomen stark aufgetrieben. Bauchdecken sehr stark gespannt. Durch Perkussion ist eine mäßige Milzvergrößerung nachweisbar. Milz aber nicht tastbar. In der Haut des Abdomens einzelne verstreute Roseolen. An den Unterschenkeln stecknadelkopfgroße, dunkelrote Flecken in der Haut. Patient ist benommen und läßt Harn und Stuhl unter sich. Im Harn Eiweiß und Indikan.

Decursus: Die Temperatur betrug am ersten Tage 38° C, an den folgenden bis zum Tode 39° C. Das Rasseln über den Lungen nimmt zu, ebenso die Benommenheit, und im Kollaps stirbt der Kranke am 28. Dezember 1902.

Am 26. Dezember 1902 war dem Patienten Blut entnommen worden und die mit diesem Serum vorgenommene Gruber-Vidalsche Reaktion ergab mit 3 Typhus abdominalis-Stämmen in der Konzentration von 1:40 ein positives Resultat.

Die klinische Diagnose lautete daher: Typhus abdominalis, Bronchitis diffusa, Pneumonia lobul. bilat., Albuminuria, Petchiae ped. utr., Suffusio antibrachii p. injectionem (Camphorae).

21 Stunden nach dem Tode nahm ich die Obduktion vor.

Sektionsprotokoll.

Der Körper 175 cm lang, von mittlerem Knochenbau, schwächerer Muskulatur, mager. Die allgemeine Decke blaß mit blassen Hypostasen rückwärts. Totenstarre vorhanden. Haupthaar dunkel. Pupillen mittelweit, gleich. Die sichtbaren Schleimhäute blaß. Hals und Brust schmal. Abdomen aufgetrieben. Außeres Genitale normal. An den unteren Extremitäten punktförmige dunkelrote Fleckchen.

Die weichen Schädeldecken blaß. Schädel, Meningen und Gehirn ohne Besonderheiten.

Das Zwerchfell beiderseits bis zur 5. Rippe reichend. Die Schilddrüse gewöhnlich. Die Schleimhaut der Halsorgane blaß. Die Lungen an der Spitze leicht fixiert, in ihren Unterlappen mit einzelnen rötlichen bis erbsengroßen Anschoppungsherden durchsetzt, sonst etwas gebläht und stärker blutreich und durchfeuchtet. Im Herzbeutel klares Serum. Das Herz ziemlich groß, reichlich fettbewachsen, sein Fleisch sehr blaß und weich. Die Klappen und die Intima der Aorta zart, die Schleimhaut der Luft- und Speiseröhre blaß.

Im Abdomen der Darm sehr stark meteoristisch. Die Leber eher etwas kleiner, sehr weich, blaß und leicht zerreiblich. In der Gallenblase blasse Galle, erstere nicht weiter verändert. Die Milz leicht geschwollen, dunkelrot, weich. Die Nieren blaß und schlaff. Die Schleimhaut der Harnblase blaß. Am Genitale nichts Abnormes. Die Schleimhaut des Magens mit einzelnen bis linsengroßen Blutungen versehen. Der Dünndarm stark ausgedehnt, seine Schleimhaut allenthalben blaß; weder seine Einzelfollikel noch die Peyerschen Plaques geschwollen. Die Schleimhäute des Dickdarmes im allgemeinen ebenfalls blaß, im Coecum und Colon ascendens mehrere Stellen, wo sich unregelmäßige quergestellte Geschwüre, einzelne mit nekrotischen Gewebsetzen, in der Mitte finden. Dieselben stehen in Gruppen von zweien und dreien, ihre Ränder zeigen keine besondere Schwellung, sie haben eine Ausdehnung bis zu 1 qcm. Im Colon transversum die Follikel, 1—2 mm im Durchmesser messend, graugelblich gefärbt, mit einem 1 mm breiten, roten Hofe umgeben. Im Rectum und der S-Schlinge keine pathologische Veränderung. Sämtliche mesenterialen Lymphdrüsen von dunkelroter Farbe, nicht vergrößert; auch die des Dickdarmes nicht geschwollen, mit Ausnahme einer in der Nähe des Coecums, die Kirschgröße hat. Pankreas und Nebennieren normal.

Da die sofort vorgenommene bakteriologische Untersuchung der Ausstrichpräparate von der Galle und vom Milzsaft keine sicheren Anhaltspunkte für Typhus abdominalis gab, wurde die pathologisch-anatomische Diagnose vorläufig in suspenso gelassen.

Die gleich nach der Sektion hergestellten Abstrichpräparate von den Pneumonieherden in der Lunge zeigten spärliche Gram-beständige Kokken zu zweien und hier und da ein nicht Gram-beständiges Stäbchen. In den von der Galle aus der Gallenblase stammenden fanden sich vereinzelte, nicht Gram-beständige, kurze Bacillen und ein paar Gram-beständige Kokken. In denen von der Milz konnte ich keine Mikroorganismen finden.

Es wurde weiter von der Galle aus der Gallenblase und dem Milzsaft auf Agarplatten gestrichen. Nach 8 Stunden zeigte sich auf den mit Galle bestrichenen ein reichliches Wachstum weißlicher, ziemlich dicker Kolonien in sämtlichen Strichen. Diese Kolonien bestanden aus nicht Gram-beständigen, gut beweglichen Bacillen, die etwas länger waren als Typhus abdominalis-Bacillen. Auf der von der Milz beschickten Platte zeigte sich auch nach mehreren Tagen kein Wachstum.

Bei der weiteren Kultivierung der Bacillen auf Zuckerglycerinagar, in Milch und auf Kartoffeln zeigte es sich, daß diese weder mit Typhus abdominalis noch mit Coli stimmten, und es wurden daher noch verschiedene andere Nährböden beschickt, um die Natur des Bacillus festzustellen. Ich lasse nun die geordneten Resultate dieser Untersuchungen folgen:

Der Bacillus, um den es sich handelte, war ein kurzes, gut bewegliches Stäbchen, das die Gramsche Färbung nicht annahm, es besaß mehrere Geißeln.

Auf Agar wuchs derselbe etwas üppiger als Typhus abdominalis und hatte eine weißlich-graue Farbe.

Im Agarstiche zeigte sich Wachstum im Stiche und an der Oberfläche.

Im Zuckerglycerinagarstiche konnte man leichte Gasentwicklung wahrnehmen.

Die Kolonien in Gelatine waren rund und zeigten eine leichte braune Färbung und Körnung; eine Aderung, wie bei Typhus abdominalis-Kolonien, war nicht zu erkennen.

Auf schräger Gelatine entwickelte sich ein weißlich-grauer, etwas durchscheinender, schleimiger Belag, der hauptsächlich im Striche wuchs ohne besondere Breitenausdehnung.

Im Gelatinestiche erfolgte Wachstum in der Gelatine und an der Oberfläche.

In Bouillon trat leichte Trübung auf.

Auf Kartoffeln entwickelte sich schon nach einem Tage ein bräunlicher, schleimiger Belag, der nach einiger Zeit eine ziemliche Dicke erreichte.

Die Milch gerann nicht, sondern wurde nach wochenlangem Stehen heller.

Indol konnte selbst in 4—5 Wochen alten Bouillonkulturen nicht nachgewiesen werden.

Auf dem Nährboden von Drigalski und Conradi entwickelten sich rasch blaue, ziemlich dichte Kolonien.

In Lackmusmolke bildete der Bacillus in den ersten 4—5 Tagen Säure, dieselbe erschien während dieser Zeit rot, später jedoch trat eine blaviolette Färbung auf, die fortan bestehen blieb.

In Neutralrotagar zeigte sich schon nach einem Tage gelbliche Fluorescenz.

Auf der Klinik des Herrn Hofrats Přibram war ebenfalls von der Sektion weg von der Milz geimpft worden und zwar mit Erfolg. Eine daher stammende Kultur, die mir freundlichst überlassen wurde, zeigte dieselben kulturellen Eigenschaften, wie die von mir aus der Gallenblase erhaltene.

Es wurde nun auch die Gruber-Vidalsche Reaktion vorgenommen, wie dies aus den folgenden Tabellen (p. 116) ersichtlich ist.

Ich will zu diesen Untersuchungen gleich bemerken, daß ich infolge Mangels von Serum die Autoagglutination nicht weiter fortsetzen konnte, dagegen wurde dieselbe an der Klinik fortgesetzt und in der Konzentration von 1 : 1000 positiv gefunden, wobei jedoch ebenfalls die obere Grenze noch nicht erreicht war. Die von mir vorgenommenen Gruber-Vidalschen Proben waren mikroskopisch untersucht worden, die auf der Klinik nur makroskopisch.

Es erübrigt nun noch, die Ergebnisse der histologischen Untersuchung anzuführen. Es wurden geschnitten Leber, Milz, Nieren, verschiedene Stellen des Dickdarmes und die vergrößerte mesenteriale Lymphdrüse.

In der Leber war mikroskopisch leichte fettige Infiltration zu erkennen, namentlich im Zentrum der Läppchen, es fanden sich in den Leberzellen kleinere und größere Fetttropfen. Außerdem war das Protoplasma der Zellen leicht gekörnt.

In der Milz fand sich geringe Vermehrung der Pulpaelemente, eine besondere Hyperämie konnte nicht konstatiert werden.

Tabelle I.
Gruber-Vidal mit den Bacillen des Falles und:

eigenem Serum	Serum von einer Sektion von T. a. vom 3. I. 1903	Serum von einer Sektion von T. a. vom 7. I. 1903	Serum von einer Sektion von T. a. vom 8. I. 1903	Serum von einer Sektion von T. a. vom 10. I. 1903	Serum von einer Sektion von T. a. vom 20. I. 1903
1:50 +	1:50 +	1:50 +	1:50 +	1:50 +	1:40 —
1:100 +	1:100 +?	1:100 —	1:100 +?	1:100 +?	
1:200 +					
1:400 +					

Tabelle II.
Gruber-Vidal mit dem Serum des Falles und:

eigenen Bacillen	Bac. T. a. aus der Sammlg. A	Bac. T. a. aus der Sammlg. B	Bac. T. a. aus der Sammlg. C	Bac. T. a. von einer Sektion vom 15. XII. 1902	Bac. T. a. von einer Sektion vom 3. I. 1903	Bac. T. a. von einer Sektion vom 5. I. 1903
1:50 +	1:50 +?	1:50 +	1:50 +	1:50 +	1:50 +	1:50 +
1:100 +	1:100 — nach 5 St.	1:100 +	1:100 +	1:100 +?	1:100 +	1:100 +?
1:200 +		1:200 +?	1:200 +?	1:200 —	1:200 +?	1:200 +?
1:400 +						

Die Nieren zeigten geringe Körnung des Protoplasmas ihrer Zellen, sonst war an ihnen keine Veränderung zu erkennen.

In der vergrößerten Lymphdrüse ließ sich Vermehrung der Lymphzellen nachweisen, außerdem fanden sich in ihr auch zahlreiche vergrößerte Endothelien mit einem, zwei oder mehreren Kernen, die stellenweise eine beträchtliche Größe erreicht hatten. Eine Ausdehnung oder stärkere Füllung der Blutgefäße war nicht zu erkennen.

Was die Veränderungen des Darmes betrifft, will ich zunächst mit denjenigen Stellen beginnen, wo die Follikel deutlicher hervortraten und dann die Beschreibung der Geschwüre anschließen.

Man fand auf Schnitten durch die Wand des Colon ascendens die Follikel zum Teil getroffen, zum Teil bloß angeschnitten. Dieselben waren nicht vergrößert, doch enthielten sie, ebenso wie die oben genannte Lymphdrüse, reichliche vergrößerte Endothelien. In der Nachbarschaft der Follikel sah man eine leichte kleinzellige Infiltration der Submucosa. Die Schleimhaut über den Follikeln war überall kleinzellig infiltriert, doch konnte man an ihr stellenweise noch gut erhaltenes Epithel erkennen. Die Submucosa zeigte in den von den Follikeln entfernten Stellen keine entzündliche Reaktion, die Muscularis war vollkommen frei davon. Unterhalb der Follikel waren die Gefäße der Submucosa dilatiert und mit Blut gefüllt.

Dort, wo Geschwüre vorhanden waren, war die Mucosa und Submucosa zum Teil ganz geschwunden, zum Teil fanden sich noch Reste der Lieberkühnschen Krypten mit ziemlich gut erhaltenem Epithel. Wo dies der Fall war, zeigten sich Submucosa, Muscularis und Serosa in gleicher Weise in mittlerem Grade von Rundzellen durchsetzt, ebenso war dies in der nächsten Nachbarschaft der Geschwüre der Fall, jedoch nur auf eine kurze Strecke. Eine besondere Schwellung der Follikel an diesen Stellen war nicht zu erkennen; die Blutgefäße waren etwas dilatiert.

Dasselbe Bild fand sich auch dort, wo die Geschwüre bis zur Muscularis reichten, nur daß dort eben Mucosa und Submucosa fehlten.

Diese Verhältnisse zeigen, daß die Veränderungen, die hier vorlagen, denen, wie wir sie bei Typhus abdominalis zu finden gewohnt sind, ganz unähnlich waren, denn es fehlte ihnen das hauptsächlichste Charakteristikum derselben, die markige Infiltration des lymphatischen Apparates; eher ähnelte das Bild dem der Dysenterie, obwohl es auch diesem nicht ganz entsprach.

In Bezug auf den Befund von Bakterien in den Schnitten gelang es mir nicht mit Sicherheit, solche in der Leber, der Milz, den Nieren und der Lymphdrüse nachzuweisen. Dagegen fanden sich in den Darmgeschwüren, in der Mucosa und Submucosa kurze Bacillen in geringer Anzahl, die sich nach Gram nicht färbten, außerdem aber auch in den oberflächlichen Schichten Gram-beständige Kokken und größere Bacillen.

Aus dem Gesagten ergibt sich wohl ohne weiteres, daß es sich in dem hier besprochenen Falle um einen Fall von Paratyphus handelt. Ich glaube, nach der neuesten zusammenfassenden Arbeit von Brion¹⁾ nicht erst ausführlich auf die Literatur zurückkommen zu müssen und mich mit einem Hinweise auf diese Publikation begnügen zu können.

Bezüglich der klinischen Angaben trifft das zu, was Brion hinsichtlich der Symptomatologie anführt, nämlich, daß der Paratyphus vom Typhus klinisch nicht zu trennen sei. Die Krankheit trat bei unserem Patienten unter Mattigkeit und Abgeschlagenheit auf, es bestanden Diarrhöen, leichter Milztumor und Roseolen, die Zunge war belegt. Das Fieber war eine Continua. Als Komplikationen traten auf Conjunctivitis und Bronchitis — alles Symptome, die für Abdominaltyphus sprechen, und, zusammengehalten mit dem positiven Ausfalle der Serumreaktion, unbedingt zur Diagnose Typhus abdominalis führen mußten. Dieselben Symptome finden sich aber auch bei Paratyphus, und es spricht daher von den klinischen Angaben nichts gegen die Auffassung der Erkrankung als solchen.

Die Diagnose konnte jedoch, trotzdem der anatomische Befund bereits den Verdacht erweckt hatte, daß es sich hier nicht um Abdominaltyphus handeln dürfte, nur durch die bakteriologische Untersuchung gestellt werden, durch welche die Identität des Erregers der Erkrankung mit dem von Feyfer und Kayser aufgestellten Typus B der Paratyphusbacillen festgestellt werden konnte. Die Beweglichkeit, das Aussehen der Kulturen auf Agar und Gelatine, das braune Wachstum auf Kartoffeln, die fehlende Milchgerinnung, die Vergärung von Zucker, das Wachstum auf dem Drigalskischen Nährboden, in Neutralrotagar und in Lackmusmolke stimmten aufs genaueste mit den über den Paratyphus B gemachten Angaben. Damit fällt auch der Verdacht, der durch den anatomischen Befund etwa rege werden könnte, daß es sich um den Kruseschen Dysenteriebacillus gehandelt haben könnte, weg.

Auch die Agglutinationsresultate sind vollkommen mit denen bei Paratyphus übereinstimmend. Die Autoagglutination ging bis 1:1000 makroskopisch, während die Agglutination von Typhus abdominalis-Bacillen durch das Serum des Falles nur bis 1:200 mikroskopisch gelang, wobei auch noch nach mehreren Stunden immer noch Bacillen beweglich blieben, die Reaktion also nicht als eine vollständig positive angesehen werden konnte.

1) Brion, Deutsche Klinik. Bd. II. 1903.

Wie verhält sich nun das anatomische Bild dazu? Wie schon gesagt, verläuft der Paratyphus nur in seltenen Fällen letal. Die Angaben über die Obduktionsbefunde sind daher sehr spärlich. Brion führt 4 Autoren an, die Todesfälle an Paratyphus beobachtet haben, schließt aber sofort die Fälle von Liepmann und Strong, und, wie ich glaube, mit vollem Rechte, aus, da es sich bei dem ersteren augenscheinlich nach dem Ausfalle der Serumreaktion um eine Mischinfektion mit Typhus abdominalis handelte — es fanden sich dabei typische, in Abheilung begriffene Typhusgeschwüre im Darne — bei dem zweiten ein Bacillus 42 Stunden nach dem Tode aus der stark zersetzten Leiche isoliert wurde, der nicht einmal vom eigenen Serum agglutiniert wurde. Es bleiben also nur die bei Brion zitierten Fälle von Longcope und von Sion und Negel, sowie ein dritter, von R. Schmidt¹⁾ zur selben Zeit publizierter, bei Brion noch nicht erwähnter Fall übrig. In dem Falle von Longcope handelte es sich um einen 22-jährigen Mann, der unter den klinischen Erscheinungen von Typhus abdominalis gestorben war. Der Bacillus, der dabei gefunden worden war, entsprach dem Paratyphus B von Kayser. Als Sektionsbefund gibt Longcope an: leichte Milzschwellung, allgemeine parenchymatöse Degeneration, herdweise Nekrose in der Leber (mikroskopisch nachgewiesen), am Darne nur deutlicheres Hervortreten der Follikel im Dickdarne, sonst nirgends Schwellung oder Geschwürsbildung, auch an den mesenterialen Lymphdrüsen nichts Abnormes.

Die Beobachtung von Sion und Negel bezog sich auf einen 24-jährigen Mann, der unter den Symptomen von Typhus abdominalis erkrankt war. Außer diesen waren aber noch Erscheinungen von seiten des Gehirns aufgetreten, nämlich Trismus, Opisthotonus, Lähmung der rechten Körperhälfte und Aphasie. Der bakteriologische Befund stimmte mit dem Typus B der Paratyphusbacillen. Anatomisch fand sich: Milztumor, parenchymatöse Degeneration, Enteritis mit dysenterieartigem Charakter im untersten Ileum, eine Laennecsche Vegetation im linken Herzventrikel, embolische Erweichungsherde im Gehirn, Infarkte der Milz und der Nieren, Bronchitis und Pneumonie. In Bezug auf den Darm ist angegeben, daß die gesamte Darmschleimhaut leicht, die des untersten Ileum und des Colon ascendens stärker gerötet war, daselbst fanden sich auch hirsekorngroß hervortretende Follikel. Im Endteile des Ileums zeigten die Schleimhautfalten in einer Ausdehnung von 10 cm graue, schmutzige, 1 mm breite Streifen, die auf eine gleichfarbige, kleienartige Ablagerung zurückzuführen waren, dieselben ließen sich leicht abschaben und unter ihnen war die Schleimhaut etwas weniger glänzend und stärker rot. Es war keine Spur von Intumeszenz oder Ulceration der Peyerschen Plaques und der Solitärfollikel, nicht die geringste Prominenz oder Injektion dieses Lymphapparates vorhanden; ebensowenig war dies bei den mesenterialen Drüsen der Fall.

In Bezug auf den Fall von R. Schmidt wäre hervorzuheben, daß der 33-jährige Patient unter pyämischen Symptomen erkrankte, die gar keine Anhaltspunkte für Typhus abdominalis boten. Die bakteriologische Untersuchung ergab einen Bacillus, der sich kulturell vollkommen wie *Bacillus typhi abdominalis* verhielt, nur daß er Spuren von Indol bildete, sich aber durch die Serumreaktion von diesem unterschied; Typhus abdominalis-Serum agglutinierte nämlich die Bacillen des Falles

1) Schmidt, R., Wien. klin. Wochenschr. 1902.

auch nicht im Verhältnisse von 1 : 10, während es die Bacillen eines Typhus abdominalis-Falles noch in der Konzentration von 1 : 16000 agglutinierte. Die Sektion ergab Endocarditis der Trikuspidalklappe und Embolie der Arterie des rechten unteren Lungenlappens, weiter eiterige Lungenabscesse und Pleuritis, hämorrhagische Nephritis, Milztumor, Cholangitis suppurativa in der Leber, Gallensteine und Entzündung der Gallenblase. Vom Darne und von den Mesenterialdrüsen ist in dem Sektionsbefunde nichts angegeben.

Nach dem Gesagten handelt es sich in dem Falle von Longcope um eine in Bezug auf klinische Symptome und bakteriologischen Befund typische Erkrankung von Paratyphus, ebenso scheint dies in dem Falle von Sion und Negel gewesen zu sein, dieser war aber außerdem kompliziert durch die klinischen Symptome von seiten des Gehirnes; der bakteriologische Befund stimmt mit dem bei Paratyphus B. Hingegen geht aus der Beschreibung des Falles von R. Schmidt hervor, daß derselbe klinisch als Pyohämie verlief und weiter der bakteriologische Befund nicht mit den von Kayser aufgestellten Typen A und B des Paratyphus in Einklang zu bringen ist. Ich glaube daher auch, die dabei beobachteten anatomischen Befunde bei meinen weiteren Ausführungen nicht weiter berücksichtigen zu müssen.

Vergleiche ich nun die drei Fälle von Longcope, Sion und Negel und mir, so zeigt sich zunächst eine Uebereinstimmung bezüglich der klinischen Symptome, sie boten sämtlich die des Typhus abdominalis, in dem Falle von Longcope und mir rein, in dem von Sion und Negel mit den obengenannten Komplikationen. Es zeigt sich weiter, daß auch der bakteriologische Befund derselbe war; in allen 3 Fällen konnte ein Bacillus gezüchtet werden, der dem Typus B des Paratyphusbacillus entsprach. Diese Uebereinstimmung erstreckt sich nun auch auf die anatomischen Befunde. Es findet sich in allen 3 Fällen Milztumor, parenchymatöse Degeneration der Organe und ein durchaus nicht für Typhus abdominalis sprechender Befund im Darmkanale. In Longcopes Falle waren nur die Follikel des Dickdarms leicht geschwollen, in dem von Sion und Negel war der Dünndarm leicht gerötet, Coecum und Colon ascendens stärker, im untersten Ileum leichte dysenterieartige Veränderung der Schleimhaut, im obersten Dickdarme die Follikel leicht geschwollen. In meinem Falle deutlicheres Hervortreten der Follikel im Dickdarme und dysenterieartige Geschwürsbildung daselbst; allen dreien ist gemeinsam das Fehlen einer typhusähnlichen Affektion besonders im Dünndarme und der Schwellung der mesenterialen Lymphdrüsen. Bezüglich der weiteren Befunde von Sion und Negel möchte ich hier nur in Kürze bemerken, daß ich die Laennecsche Vegetation im linken Ventrikel mit den konsekutiven Embolieen als eine Komplikation auffassen möchte, wie sie bei jeder schwereren Erkrankung vorkommen kann.

Darf man sich nun aus diesen drei Obduktionsfällen einen Schluß auf die pathologische Anatomie des Paratyphus erlauben, so würde derselbe lauten: Der Paratyphus ist eine Krankheit, die in anatomischer Hinsicht mit den übrigen Infektionskrankheiten gemeinsam hat den Milztumor und die parenchymatöse Degeneration der Organe, bei der aber im Gegensatz zu dem verwandten Typhus abdominalis besonders hervorsticht das Fehlen einer besonderen Ergriffenheit des gesamten lymphatischen Apparates des Darmes. Es kommt dabei im Darne höchstens zu einer dysenterieartigen Affektion.

Nun gibt es ja ohne Zweifel auch sichere Fälle von Typhus abdominalis, die ohne jede Darmveränderung und speziell ohne Schwellung des Lymphapparates des Darmes verlaufen, wie dies durch Chiari und Kraus, Opie, Blumenthal, Hensch u. a. schon seinerzeit hervorgehoben wurde. Sion und Negel bezweifeln dieses, sie wollen alle Typhen ohne Darmlokalisation auf die Infektion mit den Paracolibacillen, wie sie sie nennen, zurückgeführt wissen und sagen, daß zu der Zeit, als jene obengenannten Autoren ihre Fälle veröffentlichten, der Paratyphus noch nicht bekannt war, also eine Verwechslung mit diesem vorkommen konnte. Ich bin nun aber in der Lage, aus der allerletzten Zeit, während der ich mich schon mit der Bearbeitung dieses Falles von Paratyphus beschäftigte, 2 sichere Fälle von Typhus abdominalis ohne Darmlokalisation anzuführen.

In dem ersten Falle handelte es sich um eine 26-jährige Frau, die bei ihrer Aufnahme in die Klinik des Herrn Ober-San.-Rats Prof. Dr. v. Jaksch am 12. Dezember 1902 positive Gruber-Vidalsche Reaktion gezeigt hatte. 6 Wochen darauf starb sie. Bei der Sektion am 20. Januar 1903 fand sich eine Suffusion der Kopfhaut, im rechten Stirnlappen ein hühnereigroßer Absceß, parenchymatöse Degeneration der Organe; am Darme nur leichte Rötung und Schwellung der Schleimhaut im untersten Ileum, die mesenterialen Drüsen waren leicht geschwollen, eine davon taubeneigroß und verkäst. Als Erklärung für die Suffusion der Kopfhaut und den Gehirnabsceß sei angeführt, daß die Patientin vor ihrer Aufnahme ins Krankenhaus im Fieberdelirium aus dem ersten Stocke in den Hof gesprungen war und sich dabei am Kopfe verletzt hatte.

Die bakteriologische Untersuchung des Falles ergab kulturell aus dem Gehirnabscesse Gram-beständige Kokken und nicht Gram-beständige Stäbchen, die nicht weiter verfolgt wurden. Aus der Gallenblase konnte ein Bacillus in Reinkultur gezüchtet werden, der sich kulturell wie *Bacillus typhi abdominalis* verhielt, z. B. in Glycerinzuckeragar kein Gas bildete. Die mit dem Serum des Falles und Typhus abdominalis-Bacillen angestellte Gruber-Vidalsche Reaktion war positiv im Verhältnisse von 1:40, dieselbe mit den Bacillen des Falles und Typhus abdominalis-Serum in der Konzentration von 1:80 positiv.

Der zweite hier zu erwähnende Fall betraf ein 12-jähriges Mädchen. Dasselbe hatte ebenfalls in der Klinik des Herrn Hofrat Prof. Dr. Pribram eine positive Gruber-Vidalsche Reaktion gezeigt im Verhältnisse von 1:40. Dann war aber eine bulböse Dermatitis und Haut-hämorrhagieen aufgetreten, so daß der Verdacht auf Sepsis rege wurde. Patientin starb am 4. Februar 1903. Die klinische Diagnose lautete: Typhus abdominalis. Pneumonia lobularis. Bronchitis diffusa. Sepsis? Dermatitis bullosa. Haemorrhagiae cutis. Decubitus multiplex. Oedema pedum.

Bei der Sektion 13 Stunden nach dem Tode fand sich akuter Milztumor leichteren Grades mit einem anämischen Infarkte, leichte parenchymatöse Degeneration der Leber, katarrhalische Bronchitis und Lobulärpneumonie beiderseits, die Pusteln, Hämorrhagieen der Haut und mehrere Dekubitusgeschwüre. In Bezug auf den Darm erwies sich die Schleimhaut desselben leicht gerötet, die Follikel etwas hervortretend, die mesenterialen Drüsen leicht geschwollen.

Aus den Hautpusteln wuchs ein *Streptococcus*, aus der Gallen-

blase wuchs ein Bacillus, der sich kulturell ganz wie *Bacillus typhi abdominalis* verhielt, in Zuckernährböden kein Gas bildete. Die Gruber-Vidalsche Reaktion war positiv mit Bacillen und Serum des Falles in der Konzentration von 1 : 80, mit den Bacillen des Falles und Typhusimmunserum von 1 : 80 und mit dem Serum des Falles und zwei Typhus abdominalis-Stämmen von 1 : 80.

Ich glaube, daß aus diesen Untersuchungen schon hervorgeht, daß es sich in beiden Fällen um sicheren Typhus abdominalis ohne Darmlokalisation gehandelt habe. Diese Fälle von sogenannter primärer Typhusseptikämie sind aber doch als Ausnahmen zu bezeichnen, und ich habe in den letzten 4 Jahren, obwohl wir jährlich gegen 20 Typhus abdominalis-Fälle¹⁾ im Institute sezieren, keinen weiteren beobachten können.

Während derartige Befunde also beim Typhus abdominalis zu den Ausnahmen gehören, scheint das Fehlen oder die geringe Ausbildung einer Darmaffektion nach den bisher gemachten Beobachtungen bei Paratyphus die Regel zu sein. Und es scheint mir weiter, daß diese Annahme in den klinischen Symptomen eine Stütze finde. Es zeigt sich nämlich, daß der Paratyphus eine leichtere Erkrankung als der Typhus abdominalis darstellt, und es scheint zweitens diese Tatsache darauf zu beruhen, daß der Darmkanal nicht immer oder wenn dann in leichterem Grade und andersartig dabei affiziert erscheint. Für diese Auffassung spricht, daß eigentlich ziemlich selten Diarrhöen dabei auftreten, bloß in 18 Proz. der Fälle, wie Brion angibt, und dann die sehr selten zu beobachtenden Darmhämorrhagieen — bis jetzt bloß in 5 Proz. der Fälle beobachtet. Ich glaube, daß diese klinisch beobachteten Tatsachen wirklich für die geringere Beteiligung des Darmes bei Paratyphus sprechen, denn sonst müßten doch die Diarrhöen öfters auftreten, und ferner dafür, daß, wenn der Darm auch dabei in Mitleidenschaft gezogen wird, die Veränderungen desselben geringfügigerer Natur sein dürften, da so selten Blutungen auftreten, die ja auch bei anderen leichteren Darmaffektionen gelegentlich beobachtet werden oder aber auch bei irgendwelchen anderen septikämischen Prozessen.

Ich glaube daher, daß Fälle, bei denen klinisch die Symptome des Abdominaltyphus aufgetreten waren und in denen anatomisch eine Darmaffektion fehlt oder dieselbe vom typischen Charakter der bei Typhus abdominalis vorkommenden abweicht, den Verdacht auf Paratyphus werden erwecken müssen. Es wird aber auch dann immer nur die bakteriologische Untersuchung die Diagnose sichern können und durch diese eine Infektion mit Typhus abdominalis- oder Kruseschen Dysenteriebacillen auszuschließen sein.

1) Im Jahre 1899 17, 1900 15, 1901 27, 1902 28 Fälle. Im Januar und Februar 1903 zusammen 15.

Nachdruck verboten.

Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen.

Von C. O. Jensen,

Prof. an der tierärztlichen und landwirtschaftlichen Hochschule zu Kopenhagen.

Mit 4 Tafeln.

(Schluß.)

Untersucht man die Zellen in frischem Zustande, so findet man in nicht gar wenigen kleine Fetttropfen eingelagert, und einzelne Zellen scheinen das Objekt einer entschieden fettigen Degeneration zu sein. In einigen der größeren Krebsalveolen trifft man in der mittleren Partie häufig einen Zerfallprozeß an, so daß sämtliche Zellen abgestorben sind; diese haben zum Teil ihre äußere Form behalten, zeigen aber keine bestimmte Struktur und keinen deutlichen Kern mehr, wie sie sich auch nicht mittels der gewöhnlichen Kernfärbungsmethoden färben lassen. Ihr Aeußeres erinnert an kolloid degenerierte Zellen, von denen sie sich aber durch ihr Verhalten gegen mehrere Farbstoffe (z. B. Malachitgrün) unterscheiden. Oft ist die Grenze zwischen den lebenden und den zerfallenen Zellenschichten eine sehr scharfe. Mitunter findet man eine Grenzschicht, die sich in gefärbten Präparaten durch ihre intensive Farbe hervorhebt, die dadurch entsteht, daß der oft zerfallene Kern sich diffus und besonders intensiv färbt. Rundzellen kommen in den zerfallenen Partien gewöhnlich nicht oder nur vereinzelt vor, dagegen sieht man dann und wann homogene rundliche Körperchen in und zwischen den Zelleibern liegen, welche die Farbstoffe, z. B. Hämatoxilin, aufnehmen und sich diffus färben (Pseudoparasiten, s. später).

In den größeren Geschwülsten sind die Krebsalveolen bedeutend größer, die Bindegewebszüge zwischen denselben sind oft ganz dünn und schmal, und fast ohne Ausnahme findet man im Innern der Alveolen erhebliche Zerfallprozesse, so zwar, daß die Randpartie stets frische, lebensfähige Zellen, gewöhnlich mit ziemlich reichlichen Mitosen, zeigt. Sehr allgemein findet man in den äußeren Teilen der Zellen des Krebsalveols zahlreiche rote Blutkörperchen, die zwischen den Krebszellen liegen oder auch, worauf ich später zurückkommen werde, häufig in diese aufgenommen sind.

In seltenen Fällen (besonders bei grauen Mäusen), wo die Geschwulst aus irgend einem Grunde sehr langsam angewachsen ist, kann man das Bindegewebe stark entwickelt und zwischen den verhältnismäßig späteren Krebsalveolen breite Züge bildend finden. Die Zerfallvorgänge treten dann gewöhnlich etwas weniger hervor, auch ist die Anzahl der Mitosen meistens eine geringere.

In einzelnen Geschwülsten fand ich Abänderungen, die sich in gewissen Beziehungen von den hier besprochenen unterscheiden. So stießen mir ein paarmal Bilder auf, die allen möglichen Grund zu der Annahme gaben, daß die Druckverhältnisse den lebhaft proliferierenden Zellen recht ungünstig gewesen waren, so daß diese stellenweise eine von der gewöhnlichen abweichende Form angenommen hatten, indem sie dünner, mehr langgestreckt, zum Teil sogar spulenförmig geworden worden, so zwar, daß ihre übrigen Eigenschaften wie auch ihre eigentümliche Lagerung ganz dieselben geblieben waren wie in den anderen Geschwülsten. Einzelne Geschwülste boten ein anderes eigentümliches

Verhalten dar, indem in großem Umfange Veränderungen gefunden wurden, die ganz denjenigen entsprechen, welche unter anderem von Pianese (9) unter der Bezeichnung „Keratohyalindeneration“ beschrieben sind. Die von dieser Degeneration angegriffenen Zellen liegen teils in den peripheren Partien der Krebsalveolen in der Nähe des Bindegewebsstromas, teils auch einzeln, fleckweise oder als dünne Züge tiefer im Innern oder sogar in der Mitte der Krebsalveolen. Die Zellen sind an Form viel unregelmäßiger als gewöhnlich, oft sehr langgestreckt, zuweilen stundenglasförmig und nehmen z. B. nach Färbung nach van Giesons Methode im Gegensatz zu den normalen Geschwulstzellen Säurefuchsin und Hämatoxylin in ihren Zelleibern auf, so daß sie als braunrote Zellen mit einem meist diffus gefärbten Kern hervortreten. Auch gegen andere Farbstoffe wie Hämatoxylin, Alaunkarmin, Pianeses Martiusgelb-Säurefuchsin-Malachitgrün zeigen diese Zellen die der Keratohyalinbildung eigentümlichen Farbenreaktionen. In ganz geringer Anzahl lassen derartig veränderte Zellen sich in den meisten der untersuchten Geschwülste nachweisen. Völlig verhornte Zellen kommen, wie wir später sehen werden, nur äußerst selten vor.

Die auf Tafel II wiedergegebenen Mikrophotographien werden übrigens das mikroskopische Bild der Geschwulst veranschaulichen.

Wie ist diese Geschwulst nun aufzufassen, ist sie mit Recht als ein Carcinom zu betrachten?

Der Umstand, daß keine Metastasen vorkommen, kann in dieser Beziehung nicht entscheidend sein, da wir ja auch z. B. beim Menschen unzweifelhafte carcinomatöse Geschwülste antreffen, die nicht von Metastasenbildung begleitet sind, und, wie oben berührt, können wir auch nicht aus dem Umstande, daß die Geschwulst sich so leicht auf andere Individuen übertragen läßt, den Schluß ziehen, es handle sich nicht um ein echtes Carcinom. Da die ursprüngliche Geschwulst, wie bereits bemerkt, nicht zu so eingehender Untersuchung kam, wie erwünscht gewesen wäre, läßt sich der sichere Beweis, daß die Geschwulst ursprünglich vom epithelialen Gewebe ausging, nicht mit absoluter Gewißheit führen. Der völlig carcinomartige Bau, die scharfe Grenze zwischen den Zellenhaufen und den Bindegewebszügen, die kolloidähnliche Umbildung der Zellen in den zentralen Teilen der Krebsalveolen und nicht zum wenigsten die keratohyaline Degeneration der Zellen sprechen jedoch entschieden dafür, daß die Geschwulst wirklich epithelialen Ursprungs ist. Uebrigens scheint es mir für die folgenden Arbeiten von ziemlich untergeordneter Bedeutung, ob wir die Geschwulst als ein Carcinom oder als ein Endotheliom betrachten wollen; dieselbe ist jedenfalls eine wesentlich aus Zellen gebaute Geschwulst, die sich durch stets fortschreitendes Wachstum auszeichnet, eine Geschwulst, die mithin ihrem ganzen Charakter zufolge bösartig ist und den malignen Geschwülsten, die wir am Menschen und an unseren Haustieren kennen, an die Seite gestellt werden muß. Und es mag wohl ganz sicher sein, daß die Ergebnisse, die sich durch experimentelle Untersuchungen dieser Geschwulst gewinnen ließen, auch bei späteren Untersuchungen über andere Geschwulstformen Anleitung zu geben vermöchten.

Uebertragung der Geschwulst auf andere weiße Mäuse.

Aus der ursprünglichen Maus wurden, wie schon gesagt, Impfungen an 5 Mäusen unternommen, deren drei von der Geschwulst angegriffen

wurden. Die eine dieser drei starb 2 Monate nach der Impfung und hatte eine haselnußgroße, ziemlich weiche, etwas lappige Geschwulst an der Impfstelle unter der Rückenhaut; es fanden sich keine Metastasen. Die zweite wurde $3\frac{1}{2}$ Monate nach der Impfung getötet. Maus und Geschwulst zusammen wogen 34 g, die Geschwulst allein 20. Diese erstreckte sich über den größten Teil des Rückens als eine große knotige Anschwellung; sie war der Haut adhärent, diese war aber nicht durchulceriert. Auch bei dieser Maus wurden keine Metastasen gefunden. Die dritte Maus wurde $1\frac{1}{2}$ Monate nach der Impfung getötet. Sie hatte am Rücken eine Geschwulst von der Größe einer kleinen Walnuß; dieselbe war stark lappig, etwas weich und in der Mitte ein wenig zerfallen; auch bei dieser Maus fanden sich keine Metastasen. Aus den beiden zuletzt genannten Mäusen wurden nun 10, resp. 6 Mäuse geimpft. Bei 6 der 10 Mäuse entwickelte sich eine Geschwulst; aus der anderen Abteilung wurden zwei 8 Monate nach der Impfung getötet, ohne Geschwulstbildung zu zeigen, während sich bei den übrigen vier Geschwülste von gewöhnlichem Aussehen und beträchtlicher Größe entwickelten.

Die Impfung geschah in allen diesen Fällen auf folgende Weise: Die erkrankten Mäuse wurden durch Chloroform getötet, in Lysolwasser gelegt, mit einem reinen Tuche abgetrocknet und auf einem Brette ausgespannt, worauf die Rückenhaut mittels steriler Instrumente losdisseziert wurde. Man schnitt ein Stück der Geschwulst heraus und zerquetschte dasselbe in einem sterilen Mörser, worauf man die zerquetschte Geschwulst mit physiologischer Kochsalzlösung mischte. Von dieser Flüssigkeit, die sich unter dem Mikroskope als viele freie Zellen und ganz kleine Gewebstückchen enthaltend erwies, spritzte man darauf den Mäusen eine geringe Menge unter die Haut ein. Auf diese Weise haben wir im Laboratorium eine große Anzahl Impfungen auf Mäuse unternommen. In der letzten Zeit wandten wir dagegen meistens eine andere Impfmethode an, indem wir ca. stecknadelkopfgroße Stücke der Geschwulstmasse abschnitten und diese mittels einer scharf geschliffenen, einer Injektionsspritze angepaßten Kanüle im subkutanen Gewebe anbrachten; die Stücke steckten wir in die Kanüle, führten diese in die Subcutis hinein und schoben darauf das Stück mittels eines Stiletts hinaus. Letztere Methode brachten wir in Anwendung, teils weil es gleich den Anschein hatte, als gäbe sie zuverlässigere Resultate, teils weil wir auf diese Weise leichter zu verfolgen vermochten, was mit den eingeführten Stückchen geschah, und speziell brauchbares Material zur mikroskopischen Untersuchung der Entwicklung der neuen Geschwulst beschaffen konnten. Beim Zusammenzählen der vorliegenden Resultate erwies es sich jedoch, daß die Injektion der zerquetschten Geschwulstmasse etwas bessere Ergebnisse geliefert hat als die andere Methode.

Nehmen wir nur solche Versuche mit, wo es sich um einfache Transplantation handelt, ohne daß das Gewebe vorher besonderer Behandlung unterworfen worden wäre, so sind bis Ende Dezember 1902 im ganzen 844 Mäuse geimpft worden. 232 derselben starben im Laufe der ersten 14 Tage, zu einem Zeitpunkte also, da das Resultat der Impfung sich noch nicht mit Sicherheit feststellen ließ (meistens wegen beschwerlicher Geburt, an infektiösen Darmleiden, zuweilen an anderen Infektionen). Unter den zurückgebliebenen wurden 274 mittels Injektion der zerquetschten Geschwulstmasse geimpft, und bei 121 derselben kam es zur Geschwulstbildung; an 338 wurde Impfung mittels einverleibter Stückchen unternommen, und unter diesen wurden 128 von Ge-

schwülsten angegriffen. Lassen wir in diesen Reihen aber einige einzelne Impfungen an einer ziemlich großen Anzahl von Tieren weg, wo das Resultat ein völlig negatives war, so stellt sich das Verhältnis so, daß ungefähr die Hälfte der geimpften Tiere von Geschwulstbildung angegriffen wurde. Wie die genannten Fälle, in welchen die Impfung ein völlig negatives Resultat gab, zu erklären sind, läßt sich noch nicht mit Bestimmtheit entscheiden. Es scheint nur wenig wahrscheinlich, dies dem Umstande zuzuschreiben, daß die Geschwulst desjenigen Tieres, aus welchem geimpft wurde, plötzlich gegen andere Individuen völlig „avirulent“ geworden sein sollte, wahrscheinlicher ist die Annahme, daß die geimpften Mäuse einem Stamme angehörten, der gegen die Einwirkung der Geschwulstzellen besonders widerstandsfähig war, ein Verhalten, auf welches ich später zurückkommen werde.

Die Versuche erstrecken sich über $2\frac{1}{2}$ Jahre und die Uebertragung von Tier auf Tier umfaßt augenblicklich (Januar 1903) 19 Generationen.

In fast allen Fällen, wo es überhaupt zur Geschwulstbildung kam, war der Erfolg der Transplantation derselbe. Die einverlebten Stückchen verschwinden im Laufe weniger Tage; in ca. 14 Tagen, ausnahmsweise schon in 6—8 Tagen, kann man die Haut hindurch aufs neue ein kleines Knötchen finden. Dieses wächst während der nächsten Wochen und erreicht in 2—3 Wochen die Größe einer Erbse bis die einer Bohne, um darauf im folgenden Monat so groß wie eine Walnuß und darüber zu werden. Nach Verlauf von 2—3 Monaten kann die Geschwulst sehr beträchtlichen Umfang erlangen, so daß sie den größten Teil des Rückens des Tieres einnimmt und sich bis auf die Seite erstreckt, und nicht selten übertrifft ihr Gewicht, wie das oben angeführte Beispiel zeigt, sogar erheblich das der Maus selbst. In ganz einzelnen Fällen war das Wachstum noch weit schneller, so daß sich in 4—6 Wochen riesige Geschwülste entwickelten; in anderen, ebenfalls aber nur ganz einzelnen Fällen war das Wachstum ein ganz langsames, so daß noch nach Verlauf mehrerer Monate nur erbsen- bis bohngroße Geschwülste von ziemlich fester Konsistenz gefunden wurden. Während die Geschwülste anfangs das Tier nicht zu genieren scheinen, tritt, wenn diese eine bedeutende Größe erreicht haben, Abmagerung ein, und gewöhnlich stirbt das Tier in kachektischem Zustande. Nicht so gar selten wird die Geschwulst allmählich an die Haut adhärenz werden, dieselbe durchwachsen und durchsetzen, so daß mehr oder weniger umfassende Ulcerationsbildungen entstehen und die Mäuse an von diesen ausgehenden Infektionen sterben können.

Es scheint, daß die Beschaffenheit des eingeimpften Materials einen nicht ganz geringen Einfluß auf das Resultat hat. Soweit ich zu sehen vermag, wird das Resultat weniger sicher, wenn zur Impfung kleinere, jüngere Geschwülste benutzt werden, die noch in lebhaftem Wachstum begriffen sind, während die Uebertragung sicherer zu sein scheint, wenn man noch nicht zerfallene Stücke bereits groß gewordener Geschwülste benutzt. Die Erklärung ist vermutlich in dem Umstande zu suchen, daß man in jungen Geschwülsten Massen von Zellen in Teilung findet, und daß solche Zellen besonders empfindlich sind und wahrscheinlich die wenn auch kurze Unterbrechung des Stoffwechsels nicht ertragen können, während man in den älteren Geschwülsten weniger Mitosen und vermutlich mehr Zellen im „Stadium der Ruhe“ antrifft, wenn dieser Ausdruck zulässig ist.

Es drängt sich selbstverständlich eine Frage hervor: Wie kann

es zugehen, daß mehr als die Hälfte der geimpften Mäuse nicht von Geschwülsten angegriffen werden? Rührt dies einzig und allein von Zufälligkeiten her, so daß keine genügende Verwachsung des einverleibten Stückes mit dem lebenden Gewebe zu rechter Zeit zu stande kam, oder beruht es auf Fehlern bei der eigentlichen Impfung, auf eingedrungenen Infektionsstoffen u. dgl., oder ist die Ursache endlich anderswo zu suchen? Ich bemerke hier, daß kleine Zufälligkeiten natürlich gewiß eine Rolle spielen wie bei allen anderen Transplantationen. Ferner geschieht es selbstverständlich dann und wann, daß zugleich mit dem Stückchen Mikroben eingeführt werden, und mitunter kann man sehen, daß die kleinen eingeführten Stückchen, statt resorbiert zu werden, sich nach und nach in eine dicke, breiige Masse verwandeln, die von einer Bindegewebskapsel umgeben ist und in der sich Bakterien nachweisen lassen. Im großen und ganzen rühren die negativen Resultate aber gewiß von dem Umstande her, daß eine große Anzahl der Mäuse von vornherein immun sind, was vermutlich heißt, daß ihre Gewebssäfte auf die eingeführten Geschwulstzellen tödliche Wirkung haben; wenigstens geht aus unseren Versuchen hervor, daß diejenigen Mäuse, die einmal geimpft wurden, ohne Geschwülste zu bekommen, durch spätere Impfungen nicht angegriffen werden. Dieses Ergebnis ist indes nicht als ein absolut sicherer Beweis aufzufassen, daß die Mäuse von Anfang an immun gewesen seien, indem ja sehr wohl denkbar ist, daß die einmalige Impfung einen gewissen Grad der Immunität erzeugt hätte, so daß die negativen Resultate späterer Impfungen sich auf diese Weise erklären ließen. Die Versuche hinsichtlich dieses Punktes sind noch nicht abgeschlossen, weshalb ich mich auf deren Besprechung nicht näher einlassen werde, ich habe aber guten Grund, zu hoffen, daß sie über dieses Verhältnis hinlängliches Licht verbreiten werden, das mir unter anderem für die Wertschätzung der zahlreichen negativen, von anderen Forschern an Hunden und anderen Tieren angestellten Transplantationen von großer Wichtigkeit zu sein scheint. Verhält es sich so, daß eine Geschwulst, die wie die vorliegende sehr leicht übertragbar ist, nur die Hälfte der geimpften Tiere angreift, so könnte man sich ja sehr wohl denken, daß andere Geschwulstformen nur $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{10}$ oder eine noch weit geringere Anzahl der mit denselben geimpften Tiere angriffen; und dies fordert uns auf, uns bei Versuchen in dieser Richtung nicht mit Impfung ganz weniger Tiere zu begnügen, sondern stets eine möglichst große Anzahl anzuwenden. Verschiedene Beobachtungen, auf die ich mich indes nicht näher einlassen werde, scheinen denn auch anzudeuten, daß vielleicht eine Art Familiendisposition zur Geschwulst oder umgekehrt eine Familienimmunität gegen dieselbe vorliegt. Es dürfte deshalb bei späteren Transplantationsversuchen an Hunden guter Grund vorhanden sein, die Transplantationen soweit möglich an Individuen zu unternehmen, die zu derselben Rasse gehören wie der krebskranke Hund, oder besser noch die Versuche an Tieren anzustellen, die mit dem angegriffenen in naher Verwandtschaft stehen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß wir auf diese Weise im stande sein werden, weit sicherere Resultate zu erzielen, als dies bisher möglich war.

Uebertragung der Geschwulst auf Hausmäuse.

Außer an weißen Mäusen wurden auch Impfungen auf graue Hausmäuse (*Mus musculus*) unternommen, von welchen die weißen be-

kanntlich eine Varietät bilden. Anfangs war es mit Schwierigkeiten verbunden, die Geschwulst auf dieselben zu übertragen, indem mehrere Impfungen an einer großen Anzahl von Mäusen ein völlig negatives Resultat lieferten. Bei späteren Versuchen gelang die Impfung zu wiederholten Malen, bei Transplantation aus einer weißen Maus wurde aber nur eine geringe Anzahl angegriffen. So führe ich an, daß in einer Versuchsreihe unter 10 grauen Mäusen nur eine einzige angegriffen wurde. Nachdem die Geschwulst erst einmal auf graue Mäuse übertragen worden war, geschah die Uebertragung von grauer Maus auf graue Maus etwas leichter; im großen und ganzen wird jedoch unter den grauen Mäusen eine bedeutend geringere Anzahl angegriffen als unter den weißen. Unter 84 derartigen Transplantationen gaben nur 27 ein positives Resultat.

Die Geschwulstbildung verläuft übrigens bei den grauen Mäusen in allem wesentlichen ebenso wie bei den weißen, jedoch ist das Wachstum häufig etwas langsamer; die Geschwulst erweist sich oft als etwas reicher an Bindegewebe, wie sie auch nicht immer so beträchtliche Größe erreicht, als es bei weißen Mäusen der Fall ist.

Eine Uebertragung der Geschwulst von grauen Mäusen auf weiße zurück erwies sich als sehr leicht, und die Geschwulst erlitt hierdurch gar keine Veränderung.

Versuche der Uebertragung auf andere Tierarten.

Es wurden außerdem Versuche angestellt, die Geschwulst auf andere Tierarten zu übertragen, z. B. auf die Waldmaus (*Mus sylvaticus*), die der Hausmaus außerordentlich nahe steht. Leider war es mir nicht möglich, mir mehr als 2 Exemplare dieser Mäuseart zu verschaffen, und das Resultat wiederholter Impfung war negativ. Die Uebertragung auf Brandmäuse (*Mus agrarius*) (12 Exemplare) gab ebenfalls negatives Resultat, und dasselbe gilt von Versuchen einer Uebertragung der Geschwulst auf Feldmäuse (*Arvicola agrestis*), Rotmäuse (*Arvicola glareola*), Haselmäuse (*Myoxus avellanarius*), weiße Ratten verschiedenen Alters, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziegen und Enten. Bei sämtlichen diesen Tieren wurden die einverlebten Stückchen, wie es scheint, im Verlaufe ganz kurzer Zeit reaktionslos resorbiert; nur ausnahmsweise erhielt sich eine Zeitlang ein kleines bindegewebsartiges Knötchen an der Impfstelle.

Transplantation oder Infektion?

Es drängt sich selbstverständlich sogleich die Frage in den Vordergrund: Ist eine Geschwulst wie die vorliegende infektiösen Ursprunges? Sind die besprochenen Uebertragungen von Tier auf Tier als Transplantationen zu betrachten, oder liegt die Uebertragung eines Infektionsstoffes vor, so daß die neue Geschwulst von der reizenden Einwirkung des Infektionsstoffes eben auf das Gewebe des Tieres herrührt?

Um diese Frage ins reine zu bringen, verfolgte ich sorgfältig den Verlauf der Impfung während der nächsten Tage nach dieser an einer größeren Anzahl von Mäusen. Zu diesem Zweck legte ich wiederholt kleine, stechnadelknopfgröße Geschwulststückchen in das subkutane Gewebe. Die Mäuse wurden darauf mit dem Zwischenraum von einem Tage getötet, so daß ich im stande war, Geschwulststücke zu untersuchen, die 1, 2, 3, 4 u. s. w. Tage am neuen Aufenthaltsorte gelegen hatten. Es zeigte sich nun bei diesen Untersuchungen, daß die statt-

findenden Prozesse freilich stets dieselben sind, daß sie aber geschwinder oder langsamer verlaufen können. In Kürze wird man folgendes wahrnehmen:

Nach Verlauf von 1—2 Tagen findet man das eingelegte Stück fast völlig nekrotisch, die Zellen schwellen an und werden hydropisch, die Kerne verlieren ihr Chromatin. Die Zellen lassen sich nicht mehr färben, können aber noch 1 oder 2 Tage als rundliche, eckige Körperchen ohne bestimmte Struktur aussehen, um darauf zu einer Detritusmasse zu zerfallen (Taf. III, Fig. 5). Zwischen diesen zerfallenen Gewebsmassen bemerkt man indes gewöhnlich hie und da kleine Ansammlungen von Zellen, die ihr normales Aeußere vollständig behalten haben und sich wie normale Zellen färben lassen (Fig. 9). Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß diese Zellenhaufen, die nicht mit dem übrigen Gewebe zu Grunde gegangen sind, ihre Lebensfähigkeit bewahrt haben. Die Detritusmasse verschwindet nun sehr schnell durch Resorption. Schon nach Verlauf von 3—4 Tagen beobachtet man oft, daß das einverlebte Stückchen bedeutend kleiner geworden ist; man findet, daß es jetzt wesentlich aus Bindegewebe besteht, welches ein wenig hyalin umgebildet ist und in größerer Anzahl Risse umschließt, die den nunmehr leeren, eingefallenen Krebsalveolen entsprechen. Hie und da findet man in den Rissen noch ein wenig Detritusmasse, wie man auch an einzelnen Stellen größere Ansammlungen derselben sehen kann (Fig. 6). Die erhaltenen Zellen liegen nun mehr oder weniger von dem dergestalt eingefallenen Bindegewebe umschlossen. Ist das Stückchen größer, so trifft man erhaltene Zellenhaufen nur in der Peripherie, nie in der Mitte an.

Wieder nach ein paar Tagen wird alles abgestorbene Gewebe resorbiert sein, das Bindegewebe hat einen noch entschiedeneren hyalinen Charakter angenommen, und fast alle Bindegewebszellen im zentralen Teile des Stückes sind verschwunden. Zugleich beginnen im Umkreis und in den peripheren Teilen des Stückes eine Menge neugebildeter Gefäße wie auch zahlreiche Fibroblaste aufzutreten. Die überlebenden Krebszellen befinden sich in lebhafter Proliferation (Fig. 7); die Zellen sind kleiner als früher, die Kerne durchweg groß; Mitosen scheinen um diesen Zeitpunkt nicht vorzukommen, eine Teilung der Zellen durch direkte Kernteilung oder durch Fragmentation vermochte ich indes nicht sicher nachzuweisen. Die Zellenhaufen sind stets von dem umliegenden Gewebe scharf abgegrenzt (Fig. 10), und nie bemerkt man Bilder, die andeuten könnten, daß solche Zellenhaufen von einer Proliferation von Fibroblasten oder von anderen, dem Tiere selbst angehörenden Zellen herrührten. Was aus dem ursprünglichen, jetzt hyalin umgebildeten Bindegewebe wird, das mit absoluter Sicherheit festzustellen war mir nicht möglich. Es scheint, als ob dasselbe allmählich von der Peripherie an nach innen von Fibroblasten und kleinen Gefäßen durchwachsen wird, und aller Wahrscheinlichkeit nach verfällt es deshalb gradweise der Resorption; möglicherweise bleibt ein Teil desselben doch auch erhalten.

Während der folgenden Tage dauert die Proliferation der Zellmassen an, so daß man 8—10 Tage später oft eine ca. stecknadelknopf-große Geschwulst von typisch carcinomatösem Bau antreffen kann, mit zahlreichen, kleineren, von Zellen angefüllten Krebsalveolen und spärlichen, jedoch deutlichen untermischten Bindegewebszügen (Fig. 8).

Nach außen ist eine derartige kleine Geschwulst von zellenreichem Bindegewebe umgeben, das sich ohne scharfe Abgrenzung bis ins umliegende Gewebe fortsetzt. Um diesen Zeitpunkt findet man in den

Zellen zahlreiche Mitosen, gewöhnlich von völlig typischem normalen Aeußeren. Die Krebsalveolen wachsen nun an, und nach Verlauf von 12—14 Tagen ist es nicht ungewöhnlich, in der Mitte der größeren beginnende Zerfallsprozesse, wie oben erwähnt, anzutreffen.

Es läßt sich also nicht bestreiten, daß wir es bei diesen Uebertragungen der Geschwulst von Tier auf Tier mit einer echten Transplantation zu tun haben. Der größte Teil des Gewebes wird allerdings nekrotisch, es bleiben aber kleine Zellenhäufchen zurück, die für die Entwicklung der neuen Geschwulst die Grundlage bilden. Dies entspricht übrigens ganz dem, was Mo'rau rücksichtlich seiner Carcinome fand und ebenfalls dem, was Loeb bei seinen Rattensarkomen konstatierte.

In guter Uebereinstimmung hiermit stehen auch die Resultate von Impfversuchen mit stark zerquetschter Geschwulstmasse. Die Versuche wurden auf etwas verschiedene Weise angestellt. Bei einigen derselben wurde die Geschwulstmasse wie gewöhnlich in einem Mörser ausgerieben, darauf mit Kieselguhr gemischt und in einem zur Pulverisierung von Bakterien konstruierten Walzenapparat zerquetscht, um mit Sicherheit davon ausgehen zu können, daß keine lebenden Zellen übrig geblieben waren; die Masse wurde hierauf den Mäusen teils in die exkorierte Oberhaut eingerieben, teils in die Haut, unter dieser und in die Bauchhöhle eingespritzt, stets aber mit negativem Resultat. Selbst in solchen Fällen, wo ich die Geschwulstmasse nur stark in einem Mörser ausrieb und nach Verdünnung mit Kochsalzlösung die Flüssigkeit durch mehrere Schichten feiner Gaze filtrierte, so daß keine zusammenhängenden Gewebstückchen mit hindurchschlüpfen, wurde das Ergebnis der Impfung ein unsicheres, ja fast immer ein negatives.

Obleich es folglich keinem Zweifel unterliegen konnte, daß die Uebertragungen als wirkliche Transplantationen zu betrachten waren, hielt ich meine Aufmerksamkeit selbstverständlich dennoch auf die Frage gerichtet, ob sich in den Geschwülsten nachweisbare Parasiten vorfanden.

Präparate gut fixierter Geschwulststücke (wesentlich mit Zenkers Flüssigkeit behandelt) wurden auf mannigfachste Weise gefärbt: mit Karbolmethylenblau, Karbolfuchsin mit nachfolgender Entfärbung, nach der von Russell angegebenen Methode, nach Gram, van Gieson, Pianese u. s. w. An Präparaten, die nach diesen verschiedenen Methoden behandelt worden waren, ließen sich in einigen Geschwülsten überhaupt keine Bildungen konstatieren, die sich als Parasiten deuten oder solche auch nur vermuten lassen könnten. In anderen Geschwülsten dagegen fand ich, bald in spärlichen, bald in äußerst großen Mengen verschiedene Körperchen, die zu den sog. „Zelleinschlüssen“ zu zählen sind. Einzelne derselben lagen frei, die meisten in den Zellen eingeschlossen, in einzelnen Geschwülsten kamen diese Körperchen auch im Bindegewebe vor. In einigen Fällen handelte es sich um runde, scharfbegrenzte Körper, deren nähere Untersuchung sie mit Sicherheit als rote Blutkörperchen erkennen ließ (Fig. 11), indem sie die Größe der letzteren hatten, auf dieselbe Weise wie diese gegen Farbstoffe reagierten und eisenhaltig waren; häufig konnte man denn auch, wie Olt dies bereits an Hundecarcinomen getan hatte, Mengen von roten, freiliegenden Blutkörperchen zwischen den Krebszellen nachweisen.

Die Hauptmenge der gefundenen Körper war jedoch anderer Art. Nach van Giesons Methode gefärbte Präparate zeigten oft im Innern

der Zellen kleine kugelige, homogene Körperchen oder Tröpfchen, die sich schwach bräunlich-gelb färbten. Die kleinsten derselben waren selbst bei Immersionsvergrößerung nicht viel mehr als punktförmig, andere dagegen von bedeutenderer Größe. In einigen Geschwülsten fand sich eine geringere Anzahl derartiger Bildungen, die dafür dann erheblich größer waren (Fig. 12). Meistens lagen sie innerhalb der Zellen, häufig aber auch zwischen diesen; sie stellten homogene, kugelige oder etwas unregelmäßig gestaltete Körper ohne Spur eines Kerns dar. Sie färbten sich nach van Giesons Methode bräunlichgelb. In einigen derselben konnte man im Innern kernähnliche Flecke nachweisen (Fig. 13); diese Flecke waren ebenfalls völlig homogen ohne Spur von Struktur, zeichneten sich aber dadurch aus, daß sie sich bei der erwähnten Färbung dunkelbraun färbten. Einige dieser Flecke waren von geringer Größe, andere von recht bedeutendem Umfang, so daß sie den gelblichen Körper fast ganz ausfüllten. Häufig fand man 2 oder noch mehr, langgestreckte, unregelmäßige oder rundliche Flecke der genannten Art, die man mit etwas gutem Willen vielleicht als Kerne deuten könnte. In einzelnen Fällen traf ich in besonders großen Körperchen sogar eine Anzahl runder Kügelchen an, so daß der ganze Körper einem Schmarotzer mit Sporen ähnlich sein konnte (Fig. 14). Wie diese Zelleinschlüsse eigentlich zu deuten sind, muß ich dahingestellt sein lassen; von Blastomyceten kann hier jedenfalls nicht die Rede sein, obschon diese Körperchen ja große Aehnlichkeit mit denjenigen Bildungen darbieten, die in den Geschwülsten gefunden und als solche beschrieben worden sind. Verfolgt man diese Bildungen von den ganz kleinen Punkten und Tröpfchen in den Zellen an bis sie beträchtlichere Größe erreicht haben, so erhält man mehr den Eindruck, daß es sich um eine Art intrazellulärer Sekretion oder, wenn man so will, um eine kolloidähnliche Degeneration handelt. Diese Körperchen behalten zum Teil ihre Fuchsinfarbe bei Entfärbung mit Säure und verbleiben farbig nach Grams Methode, während sie dagegen, nach Russells Methode gefärbt, sich häufig mehr oder weniger entfärben. Von kolloiden Bildungen unterscheiden sie sich u. a. dadurch, daß sie mit Malachitgrün nicht stark gefärbt werden.

In Präparaten, die nach der von Borrel (10) angegebenen Methode gefärbt worden waren, wies ich in einzelnen Geschwülsten eine allerdings nur ganz geringe Anzahl Bildungen nach, die den von Sawtchenko und Borrel angegebenen entsprechen, und die den Untersuchungen des letzteren zufolge vermutlich ja als bloße Zentrosomen zu deuten sind.

Wie früher erwähnt, fand in einzelnen Geschwülsten eine Keratohyalindegeneration statt. Die von dieser Umbildung betroffenen Zellen haben, wie oben berührt, ein ziemlich unregelmäßiges, oft langgestrecktes, ja keulen- oder stundenglasförmiges Aeußere, wie sie sich auch durch die recht homogene Beschaffenheit des Kerns von den gewöhnlichen Zellen wesentlich unterscheiden. Diese Zellen, die teils zerstreut zwischen den anderen Krebszellen lagen, teils in größerer Anzahl gesammelt waren, namentlich in den peripheren Teilen der Krebsalveolen, ähneln völlig den von Pianese (11) abgebildeten kerato-hyalin degenerierten Zellen, die er mit Korotnefs „Schmarotzern“: *Rhopalocephalus carcinomatosus* identifiziert. Einzelne der solchergestalt umgebildeten Zellen waren abgeplattet und gekrümmt und lagen unmittelbar an einer anderen Zelle (Fig. 15); mitunter fand sich eine Krebszelle von zwei solchen ab-

geplatteten, gekrümmten Zellen umgeben, die eine Art Kapsel um die Krebszelle bildeten (Fig. 16); die völlige Verhornung derartiger Zellen kann die Bildung von Pseudococcidien veranlassen. Auch in einer anderen Weise können coccidienähnliche Körperchen entstehen; so fand ich wenige Male in den Geschwülsten eine eigentümliche Umbildung einzelner Zellen; der Körper derselben war homogen, lichtbrechend geworden und zugleich stark verkleinert, so daß die Zelle als ein freies, ovales Körperchen zwischen den gewöhnlichen Zellen liegt; die Kerne können eine Zeitlang ihre ursprüngliche Gestalt behalten, werden aber nach und nach homogen.

Bakterien ließen sich bei mikroskopischer Untersuchung nie in den Geschwülsten konstatieren. Die verschiedenen Geschwülste enthielten, wie oben berührt, eine verschiedene Anzahl der genannten Pseudoschmarotzer. In einigen waren diese überhaupt nicht zu konstatieren, in anderen aber in großer Menge vorhanden. In größter Menge fand ich sie in einer ganz frischen Geschwulst, die ich ca. 10 Tage nach der Impfung untersuchte, ferner in einer Geschwulst, die sich infolge einer Serumbehandlung teilweise in Zerfall und Resorption befand, und endlich bei einer grauen Maus in einer Geschwulst, die sich sehr langsam entwickelte, reich an Bindegewebe war und keratohyaline Umbildung eines großen Teiles der Krebszellen zeigte.

Außer diesen mikroskopischen Untersuchungen wurden ziemlich umfassende Züchtungsversuche mit aseptisch herausgenommenen Geschwülsten angestellt, indem zur Verwendung kamen: gewöhnliche Gelatine, Agar-Agar, Serumagar, Agar mit Zusatz von Ascitesflüssigkeit, erstarrtes Serum, Zwetschengelatine, Bouillon und Bouillon mit Zusatz von Serum, bzw. Ascitesflüssigkeit. Die besäeten Gläser wurden teils bei Körpertemperatur, teils bei Zimmertemperatur erhalten; es wurden Methoden angewandt, die aerobes Wachstum gestatteten, außerdem aber auch solche, die zur Züchtung anaerober Formen benutzt werden. Nur wenige Male entstanden Kulturen einer kleinen Bacillenart, die sich als für Mäuse durchaus unschädlich erwies, und die vermutlich einige Generationen hindurch von Geschwulst auf Geschwulst mitgeschleppt worden war. Später wurde die Bacillenform nicht wieder beobachtet. Kulturen von Blastomyceten kamen nie vor.

Die mikroskopischen Untersuchungen und die Züchtungsversuche leisteten also der Annahme, daß die Geschwulst infektiöser Entstehung sein sollte, durchaus keinen Anhaltspunkt. Der Nachweis der Persistenz der Zellenhaufen bei der Uebertragung und die negativen Resultate nach Einimpfung der zerquetschten Geschwulstmasse widersprechen entschieden der parasitären Entstehung der Geschwulst, wenn sie auch nicht völlig ausschließen, daß es sich um eine Symbiose von Zellen mit einem vermutlichen Schmarotzer handeln kann. Die zahlreichen, im folgenden zu referierenden Versuche über die Widerstandsfähigkeit des Schwulstgewebes gegen äußere Einwirkungen zeigen, daß das Geschwulstgewebe sich in dieser Beziehung wesentlich wie anderes tierisches Gewebe verhält und sprechen mithin ebenfalls gegen die parasitäre Entstehung der Geschwulst.

Vita propria der Zellen.

Da es mir von nicht geringem Interesse schien, zu sehen, wie widerstandsfähig gegen verschiedene äußere Einwirkungen das Krebsgewebe

ist, wurden ziemlich umfassende Reihen von Versuchen angestellt, teils über die Lebensfähigkeit des Gewebes, nachdem es vom Organismus getrennt worden war, teils über dessen Widerstandsfähigkeit gegen Wärme, Kälte, intensives Licht, Eintrocknen und gegen die Einwirkung gewisser Antiseptica.

Die Versuche hinsichtlich der „Vita propria“ des Krebsgewebes wurden folgendermaßen ausgeführt:

Nach Tötung der Maus durch Chloroform schnitt man unter antiseptischen Maßregeln Geschwulststücke aus, die in sterilen Reagenzgläsern angebracht wurden, wo sie verschiedene Zeiträume hindurch blieben; darauf fand Impfung statt und in der Regel wurden zu jedem Versuche 5 Mäuse benutzt. In den meisten Fällen wurde die Geschwulstmasse zerquetscht, mit Kochsalzlösung ausgerieben und auf obengenannte Weise eingespritzt; nur bei einzelnen Versuchen geschah die Impfung mittels Einverleibung kleiner Geschwulststücke. Da es von vornherein wahrscheinlich war, daß die Lebensfähigkeit der Zellen sich als verschieden erweisen würde, je nachdem dieselben sich in höherer oder niedriger Temperatur befanden, wurden 3 Reihen von Versuchen angestellt. In der einen wurden die Gläser bei Körpertemperatur aufbewahrt, bei der zweiten standen sie im Laboratorium bei ca. 16—18° C, während sie in der dritten Reihe bei einer Temperatur, die zwischen 1 und 3 bis 4° C variierte, in einem Eisschrank aufgehoben waren.

Zur Impfung wandte man bei den Versuchen, die man zu vergleichen wünschte, soweit möglich Stücke derselben Geschwulst an, die, auf Reagenzgläser verteilt, z. B. 2, 4, 6, 8, 12, 20 Tage lang aufbewahrt wurden. In sämtlichen Fällen gaben Kontrollimpfungen mit dem zum Versuche angewandten Geschwulstgewebe ein positives Resultat.

Das Ergebnis der ersten Reihe von Versuchen ist aus beigefügtem

Tab. I. Versuche mit bei 37° C aufbewahrtem Geschwulstgewebe.

Das Geschwulstgewebe hatte gelegen	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh gestorbene Mäuse	Mäuse mit negativem Resultat	Mäuse mit positivem Resultat	
24 Stunden	4	4	—	—	Das Gewebe völlig zerfallen
48 „	4	—	4	0	
72 „	4	2	2	0	

Schema zu ersehen und war in Kürze folgendes: Das Geschwulstgewebe erwies sich außer stande, sich 24 Stunden lebend zu erhalten, indem keine der mit solchem Gewebe geimpften Mäuse von Geschwülsten angegriffen wurde.

Wurde das Geschwulstgewebe bei gewöhnlicher Zimmertemperatur aufbewahrt, so zeigte es sich im Besitze bedeutend größerer selbständiger Lebensfähigkeit. Wie die Uebersichtstabelle angibt, war nicht nur Geschwulstgewebe, das 24 Stunden gelegen hatte, im stande, nach Einimpfung Geschwülste zu erregen, sondern auch nach 2—12-tägigem Aufbewahren hatte die Lebensfähigkeit des Gewebes sich erhalten, so daß nach Impfung auf Tiere positive Resultate erschienen. Bei längerem Aufbewahren starben die Zellen und die Transplantationsversuche mit solchem Gewebe gaben negatives Resultat.

Tab. II. Das Geschwulstgewebe bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Das Geschwulstgewebe hatte gelegen	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh gestorbene Mäuse	Mäuse mit negativem Resultat	Mäuse mit positivem Resultat
1 Tag	5	2	0	3
2 Tage	4	—	3	1
	4	—	2	2
4 "	4	—	4	0
8 "	4	—	1	3
12 "	4	—	3	1
	4	—	2	2
13 "	4	1	3	0
14 "	5	—	5	0
	4	—	4	0
16 "	4	—	4	0
18 "	4	—	4	0

Wurde das Gewebe im Eisschranke aufbewahrt, so erhielt es sich noch länger lebend, indem ich noch, nachdem es 18 Tage lang gelegen hatte, positiven Ausfall der Impfung erhielt.

Tab. III. Das Geschwulstgewebe bei 1—3° C im Eisschrank aufbewahrt.

Das Geschwulstgewebe hatte gelegen	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh gestorbene Mäuse	Mäuse mit negativem Resultat	Mäuse mit positivem Resultat
24 Stunden	5	—	2	3
	6	3	2	1
30 "	5	—	2	3
2 Tage	4	—	2	2
	4	—	2	2
4 "	4	—	2	2
	6	—	3	3
5 "	4	—	1	3
6 "	4	—	3	1
7 "	4	—	3	1
8 "	4	2	1	1
9 "	5	—	4	1
10 "	4	—	4	0
12 "	4	2	1	1
14 "	4	—	2	2
16 "	4	1	1	2
18 "	4	—	2	2
	4	1	3	0
20 "	4	—	4	0
	4	—	4	0
22 "	4	1	3	0
24 "	4	—	4	0

Dieser in die Augen fallende Unterschied der Versuchsreihen läßt sich ziemlich sicher folgenderweise erklären: Die Zellen sind, solange sie bei Körpertemperatur gehalten werden, nicht im stande, den Stoffwechsel zu entbehren, und wird dieser unterbrochen, wie im Versuche, fallen sie schnell dem Tode anheim; werden sie dagegen bei niederen Temperaturen aufbewahrt, so fallen sie in eine Art Ruhezustand, während

dessen sie den Stoffwechsel lange zu entbehren vermögen¹⁾.

Selbstverständlich erhalten wir bei einer Versuchsanordnung wie dieser keine völlig klare und genaue Auskunft darüber, wie lange die Zellen sich nach dem Tode der Maus unter den verschiedenen Verhältnissen am Leben erhalten haben, indem man ja nicht behaupten darf, die Zellen seien in den Fällen, wo man negatives Resultat der Impfung erhielt, schon vor dieser abgestorben; es ist ja sehr wahrscheinlich, daß Zellen, die noch lebend sind, sich aber in geschwächtem Zustande befinden, sich unter den neuen Umgebungen nach der Transplantation weit schwieriger zurechtfinden und deshalb auch leichter unterliegen werden. Die Versuche geben aber doch leidliche Haltepunkte für die Beurteilung der selbständigen Lebensfähigkeit der Zellen.

Vergleichen wir die hier mit dem Geschwulstgewebe erreichten Resultate mit dem, was wir über die Lebensfähigkeit der normalen Epidermis wissen, wie Transplantationsversuche dieselbe dargelegt haben, so finden wir, daß das Geschwulstgewebe im Besitz einer etwas geringeren Lebensfähigkeit ist als die normale Oberhaut. So kann angeführt werden, daß Wentscher (12) mit Hilfe von Transplantationsversuchen nachwies, wie die Epidermis 22 Tage lang ihre Lebensfähigkeit zu erhalten vermag, und daß Ljunggren (13), der Epidermisstückchen in steriler Ascitesflüssigkeit aufbewahrte, noch nach Verlauf eines Monats das Gewebe lebend fand, so daß Transplantation mit demselben positives Resultat lieferte. Unter anderen Versuchen, die sich zum Vergleich heranziehen lassen, können wir besonders Donatis und Solieris (14) Experimente mit Periost von Hühnern nennen; sie erlangten positives Resultat, wenn das Gewebe nicht über 192 Stunden bei 3—6°, 168 Stunden bei Zimmertemperatur oder 100 Stunden bei 40—41° gelegen hatte.

Die Einwirkung höherer Temperaturen auf die Lebensfähigkeit des Geschwulstgewebes.

Die Versuche wurden folgendermaßen angestellt: Das Geschwulstgewebe wurde in einem Mörser zerquetscht, in Kochsalzlösung ausgerieben und in dünnen Reagenzgläsern angebracht, die ein Thermometer enthielten. Darauf tauchte man die Reagenzgläser in heißes Wasser, bis die erwünschte Temperatur erreicht war, was gewöhnlich nur $\frac{1}{4}$ Minute dauerte, und brachte dieselben nun in einem Wasserbade von derjenigen Temperatur an, deren Einwirkung man zu untersuchen wünschte. Um den Versuch nicht gar zu umfassend zu machen, wurden nur Untersuchungen über die 5 Minuten dauernde Einwirkung der verschiedenen Temperaturen angestellt, und die gewählten Temperaturen waren 45, 46, 47, 48, 50 und 55°.

Wie aus dem Schema hervorgeht, war die Einwirkung von 45—46° nicht im stande, das Geschwulstgewebe zu töten, während wir dagegen bei Temperaturen von 47° oder darüber stets ein negatives Resultat der Impfung erhielten.

Des Vergleiches wegen führen wir rücksichtlich des normalen Ge-

1) Bei der Aufbewahrung bei Körpertemperatur tritt eine teilweise Selbstverdauung ein; die Fermententwicklung steht aber wahrscheinlich in Verbindung mit dem Absterben der Zellen.

Tab. IV. Das Geschwulstgewebe erwärmt und darauf eingepft.

Temperatur	Dauer	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh ge- storbene Mäuse	Anzahl der Mäuse mit negativem Resultat	Anzahl der Mäuse mit positivem Resultat
45 °	5 Min.	4	—	2	2
46 °	—	4	2	1	1
46 °	—	4	1	3	0
47 °	—	4	1	3	0
48 °	—	4	—	4	0
50 °	—	5	—	5	0
55 °	—	4	—	4	0

webes an, daß Wentscher durch Transplantationsversuche zu konstatieren vermochte, daß die Epidermis noch nach 14-stündiger Erhitzung auf 50° lebensfähig war. Auch gegen diese Einwirkung ist das Geschwulstgewebe also weniger widerstandsfähig als das normale Gewebe.

Der Einfluß starker Abkühlung auf die Lebensfähigkeit des Geschwulstgewebes.

Besonderes Interesse dürften die Untersuchungen über die Einwirkung der Kälte auf das Geschwulstgewebe darbieten, da das Gefrieren bekanntlich als Heilmittel gewisser Geschwulstformen in Vorschlag gebracht worden ist (Howitz).

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: Man rührte die zerriebene Geschwulstmasse in physiologischer Kochsalzlösung aus und brachte sie in dünnwandigen Reagenzgläsern an, die mit einem Thermometer versehen in die verschiedenen Kältemischungen getaucht wurden; es war mit ziemlich großen Schwierigkeiten verbunden, die Gläser mehrere Minuten lang bei derselben Temperatur zu erhalten, soweit möglich wurde dies jedoch durchgeführt, und große Schwankungen traten nicht ein. Man benutzte zu höheren Temperaturen Mischungen von Salz, Eis und Wasser, zu größeren Kältegraden Mischungen von Schnee und Chlorcalcium, ferner Kohlensäureschnee und Mischungen desselben mit Alkohol, bzw. Aether, und endlich zu einem einzelnen Versuche flüssige Luft. Auf diese Weise erreichte man Temperaturen zwischen $\div 1$ und wahrscheinlich ca. $\div 180^{\circ}$.

Das Resultat der Versuche geht aus untenstehender tabellarischer

Tab. V. Das Geschwulstgewebe stark abgekühlt und darauf eingepft.

Temperatur	Dauer	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh ge- storbene Mäuse	Anzahl der Mäuse mit negativem Resultat	Anzahl der Mäuse mit positivem Resultat
ca. $\div 180^{\circ}$	4—5 Min.	4	—	4	0
ca. $\div 100^{\circ}$	ca. 10 "	4	—	4	0
ca. $\div 70^{\circ}$	ca. 10 "	4	—	4	0
$\div 20^{\circ}$	3 "	4	—	4	0
$\div 18^{\circ}$	5 "	4	—	2	2
$\div 16-17^{\circ}$	5 "	4	1	2	1
$\div 12^{\circ}$	5 "	4	—	2	2
	30 "	4	1	3	0
$\div 10^{\circ}$	10 "	4	—	3	1
	3 "	4	—	4	0
$\div 5^{\circ}$	3 "	4	1	2	1
$\div 2^{\circ}$	2 "	4	1	2	1

Uebersicht hervor, aus der zu ersehen ist, daß eine 10 Minuten dauernde Abkühlung auf $\div 10^{\circ}$ das Gewebe nicht zu töten vermochte, während die 30 Minuten dauernde Einwirkung derselben Temperatur dazu im stande war. Eine kurze oder sogar 5 Minuten lange Abkühlung auf Temperaturen von $\div 12, 16$ und 18° vermochte ebenso wenig das Gewebe zu töten, während dies dagegen durch eine 5 Minuten anhaltende Abkühlung auf niedrigere Temperatur, wie es schien, mit Sicherheit bewirkt wurde.

Es ist selbstverständlich schwer, mittels derartiger Versuche durchaus genaue und zuverlässige Resultate zu erzielen, weil man wohl kaum sicher sein kann, daß sämtliche Teile der Geschwulstmasse genau gleich stark abgekühlt sind, ferner weil die Impfungen ohnehin nicht immer ein absolut zuverlässiges Resultat geben, indem, wie früher hervorgehoben, mitunter Fälle vorkommen, wo man nach Impfung von z. B. 5—10 Mäusen nicht einmal bei der Hälfte, sondern nur bei ganz einzelnen Anschlag erhält. Da die Versuchsergebnisse aber in so guter Uebereinstimmung miteinander stehen, wird man den obengenannten Schluß jedoch mit ziemlicher Sicherheit ziehen können. Was hier von den Abkühlungsversuchen gesagt wurde, gilt im wesentlichen natürlich auch von den Erhitzungsversuchen und anderen Versuchsreihen, die im folgenden genannt werden.

Die tödliche Wirkung des Lichtes auf das Geschwulstgewebe.

Versuche über die tödliche Wirkung des Lichtes auf die Geschwulstzellen wurden in Finsens medizinischem Lichtinstitute unter Leitung des Dr. Hans Jansen, Assistenten am Laboratorium angestellt.

Zur Beleuchtung wurde ein Finsenscher Konzentrationsapparat (15) angewandt, wie dieser zur Behandlung der Lupuspatienten benutzt wird. Die Lichtquelle war eine Kohlenbogenlampe von ca. 70 (65—70) Ampères, die Stromstärke ca. 50 (48—51) Volt; die Dicke der Kohle $\frac{30 \text{ mm}}{22 \text{ mm}}$; der Diameter der Frontlinse war 8 cm, deren Entfernung von der Lichtquelle 13 cm. Die Lichtstärke entsprach im wesentlichen der bei der Behandlung des Lupus zur Anwendung kommenden.

Die Versuche geschahen folgendermaßen: Die Maus wurde getötet; die Geschwulst wurde losdisseziert und in einer sterilen Glasschale angebracht, und aus den am wenigsten zerfallenen Teilen derselben wurden kleine Stückchen ausgeschnitten. Zur Beleuchtung wurde ein von Dr. Jansen (16) konstruierter und abgebildeter Apparat angewandt, welcher aus 2 Quarzplatten besteht, die dergestalt in einer Einfassung von Messing angebracht sind, daß sie sich mehr oder weniger eng aneinander pressen lassen. Wir legten die Gewebstückchen zwischen die Quarzplatten und drückten diese gegeneinander, so daß wir eine gleichmäßige, dünne Schicht halbzerquetschter Geschwulstmasse bekamen. Soweit möglich, vermieden wir die Benutzung von Geschwulststückchen, welche zerfallene Stellen oder sichtbare Mengen Blutes enthielten. Die kleine Quarzkapsel mit dem Geschwulstgewebe brachten wir im Lichtkegel des Konzentrationsapparats an und zwar in solcher Entfernung von letzterem, daß sie sich ein wenig hinter dem Brennpunkte an einer Stelle befand, wo der Kegel einen Durchmesser von 18 mm hatte. Durch Ueberrieselung beider Seiten der Quarzschachtel

mit Wasser verhinderten wir die Erwärmung der Gewebstücke auf Temperaturen über 25—30° C.

Nach verschiedener Zeit andauernder Beleuchtung impften wir die Geschwulstteile auf gewöhnliche Weise in die Subcutis weißer Mäuse ein; zu jedem Versuche wurden in der Regel 5 Mäuse benutzt, und der Sicherheit wegen wurde stets zugleich Impfung mit nichtbeleuchteten Teilen des Geschwulstgewebes an einer gleichen Anzahl Mäusen unternommen.

Es wurden 5 Reihen von Versuchen ausgeführt; die erste mit dickeren Schichten Geschwulstmasse, die übrigen mit 0,2 mm dicken Schichten; in den beiden ersten Versuchsreihen wurde das Gewebe nur von der einen Seite beleuchtet, in den übrigen wurde die Quarzkapsel dagegen nach Verlauf der halben Beleuchtungsdauer so gedreht, daß nun die entgegengesetzte Fläche der Lichtquelle zugekehrt war; hierdurch erzielte man die gleichmäßigere Beleuchtung der gesamten Gewebmasse.

Das Ergebnis der Versuche ist aus untenstehenden Tabellen zu sehen.

Tab. VI. Einwirkung des Lichtes. — Die Versuchsreihen I—II.

Dicke der Gewebmasse	Dauer der Beleuchtung	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh gestorbene Mäuse	Mäuse mit negativem Resultat	Mäuse mit positivem Resultat	
1 mm	1 Stunde	5	4	0	1	} Versuchsreihe I. (Die Stromstärke bei diesem Versuche schwächer, ca. 60 Am-pères.)
0,5 "	15 Minuten	5	1	1	3	
	5 "	5	—	4	1	
Kontrolle	(nicht beleuchtet)	5	1	1	3	
0,2 mm	2 Stunden	5	—	5	0	} Versuchsreihe II.
	1 Stunde	5	—	5	0	
	1/2 "	4	—	4	0	
Kontrolle	(nicht beleuchtet)	5	—	2	3	

War das Gewebe 1 mm dick, so vermochten die Lichtstrahlen also nicht, dasselbe in dem Umfange zu durchdringen, daß das Gewebe getötet wurde, selbst bei lange andauernder Beleuchtung. Bei einer Gewebdicke von 0,5 mm war auch eine 15 Minuten dauernde Einwirkung des Lichtes hierzu nicht genügend, während eine 1/2-stündige Beleuchtung nur 0,2 mm dicker Gewebsscheiben mit Sicherheit tödlich auf die Zellen wirkte.

Die folgenden Versuchsreihen wurden alle drei auf dieselbe Weise, mit derselben Dicke des Gewebes und mit Beleuchtung beider Seiten (s. oben) ausgeführt.

Es geht hieraus hervor, daß das intensive Licht die Geschwulstzellen leicht tötet. Es läßt sich nicht entscheiden, wie kurz die Einwirkung zu sein braucht, um die einzelnen Zellen zu töten; aus den beiden letzten Versuchsreihen ist indes ersichtlich, daß sämtliche Gewebsteile einer 0,2 mm starken Schicht nach Verlauf von 1—2 Minuten getötet waren, wenn die Beleuchtung, wie angeführt, abwechselnd beide Flächen der Schicht getroffen hatte. In Uebereinstimmung mit früheren Erfahrungen und Beobachtungen haben die Versuche zugleich dargetan, daß die wirksamen Lichtstrahlen nur in verhältnismäßig geringem Grade im stande sind, in die Gewebe einzudringen, und daß

Tab. VII. Die Versuchsreihen III—V.

Dicke der Gewebsmasse	Dauer der Beleuchtung	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh gestorbene Mäuse	Mäuse mit negativem Resultat	Mäuse mit positivem Resultat	
0,2 mm Kontrolle	30 Minuten	5	—	5	0	} Versuchsreihe III
	20 „	5	1	4	0	
	10 „	5	—	5	0	
	(nicht beleuchtet)	5	—	4	1	
0,2 mm Kontrolle	10 Minuten	5	3	2	0	} Versuchsreihe IV
	5 „	5	1	4	0	
	2 „	4	—	4	0	
	1 Minute (nicht beleuchtet)	4	—	1	3	
0,2 mm Kontrolle	10 Minuten	5	—	5	0	} Versuchsreihe V
	5 „	5	4	1	0	
	2 „	5	2	3	0	
	1 Minute (nicht beleuchtet)	5	1	4	0	
		5	—	3	2	

ihre Wirkung auf die Zellen, nachdem sie eine nur 0,5 mm dicke Gewebsschicht passiert haben, schon erheblich abgeschwächt ist, wenn man auch bei mehr als 15 Minuten andauernder Beleuchtung wahrscheinlich die Destruktion einer Gewebsschicht von dieser Dicke erreichen wird.

Das Resultat der Versuche bietet gewisses Interesse dar, weil man noch nicht ganz darüber im Reinen ist, inwiefern man bei Behandlung des Lupus (und des Cancer) mit Licht wesentlichst mit einer direkt tödlichen Wirkung auf die Schmarotzer und die pathologischen Zellen oder nur mit einer indirekten Wirkung mittels hervorgerufener Zirkulationsänderungen zu schaffen hat, eine Frage, die gegenwärtig im Lichtinstitute näherer Untersuchung unterworfen wird.

Die Wirkung der Eintrocknung des Geschwulstgewebes.

Es war sehr wahrscheinlich, daß das Geschwulstgewebe — wie die tierischen Zellen überhaupt — sich sehr empfindlich gegen Eintrocknung zeigen würde. Es wurden, um dies zu illustrieren, 3 Versuche angestellt.

Ein Stück einer Geschwulst wurde im Mörser verrieben; die Masse wurde in 2 sterilen Glasschalen ausgebreitet; die eine wurde $3\frac{1}{2}$ Stunden im Exsiccator über Schwefelsäure angebracht, während die andere $1\frac{1}{2}$ Stunden lang der Luft ausgesetzt wurde, bis die Gewebsmasse trocken war. Von einer anderen Geschwulst wurde in ähnlicher Weise die gequetschte Gewebsmasse ca. $\frac{1}{2}$ Stunde der Einwirkung der Luft ausgesetzt, so daß die Gewebsmasse halbtrocken war. Die so behandelten Gewebsteile wurden dann in Kochsalzlösung verteilt und an Mäusen subkutan injiziert. Zu jedem Versuche wurden 5 Mäuse angewandt und nicht eingetrocknete Teile derselben Geschwulst wurden zur Kontrolle an anderen Mäusen in derselben Weise eingepfht. Die Resultate der Impfungen mit der eingetrockneten Masse war, wie Tab. VIII zeigt, völlig negativ; die Zellen hatten selbst eine nur teilweise Eintrocknung nicht ertragen können.

Tab. VIII. Wirkung der Eintrocknung.

Behandlungsweise des Gewebes	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh gestorbene Mäuse	Mäuse mit negativem Resultat	Mäuse mit positivem Resultat
a) über Schwefelsäure getrocknet	5	—	5	0
b) an der Luft getrocknet	5	—	5	0
c) nicht vollständig eingetrocknet	5	—	5	0
Kontrolle	16	5	6	5

Einwirkung von Antiseptica auf das Geschwulstgewebe.

Es schien mir von gewissem Interesse zu sein, zu untersuchen, wie verschiedene antiseptische Flüssigkeiten auf das Geschwulstgewebe wirken, teils um hierdurch für oder wider die Annahme, die Geschwulst könne von Infektionsstoffen herrühren, Anhaltspunkte zu bekommen, teils weil mehrere Antiseptica unter der Form von Injektionen in die Geschwulstmasse selbst ja beim Menschen therapeutische Anwendung gefunden haben. Diese Versuche bieten indes noch größere Schwierigkeiten dar als die bereits genannten. Zerquetscht man die Geschwulstmasse so fein, daß man nur losgerissene Zellen und keine zusammenhängenden kleinen Gewebstückchen hat, so wird das Resultat der Impfung nämlich ein ziemlich unsicheres, während andererseits, wenn sich in der Aufschlemmung kleine Gewebstücke befinden, die Einwirkung der antiseptischen Stoffe auf die ganz kleinen und auf die etwas größeren Klümpchen eine verschiedene werden muß.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: Nach sorgfältigem Ausreiben der Geschwulst mit Kochsalzlösung in einem Mörser filtrierte man dieselbe durch Gaze, so daß jedenfalls nur ganz kleine Gewebstückchen mit hindurchpassieren konnten, und mischte sie darauf vorsichtig mit ebenso viel Teilen einer antiseptischen Lösung. Wünschte man z. B. die Wirkung von 1 Proz. Karbolsäure zu prüfen, so mischte man gleiche Teile der Geschwulstaufschlemmung und 2-proz. Karbolwassers zusammen. Nachdem man das Geschwulstgewebe der Einwirkung dieser Flüssigkeit so lange, wie man wünschte, ausgesetzt hatte, goß man eine große Menge steriler Kochsalzlösung hinzu, worauf die Flüssigkeit ein paar Minuten lang geschüttelt und zentrifugiert wurde. Die klare Flüssigkeit wurde abgossen, der Bodensatz dagegen mittels abermaliger Aufschlemmung in steriler Kochsalzlösung ausgewaschen, um nach nochmaligem Zentrifugieren auf Tiere geimpft zu werden.

Zu den Versuchen wurde teils Karbolsäure, teils Pyoktanin benutzt, letzteres wesentlichst, weil es bekanntlich therapeutische Anwendung gefunden hat.

Karbolsäure wurde in Lösungen von 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{8}$ Proz. gebraucht.

Es zeigte sich, daß die 5 Minuten dauernde Einwirkung einer $\frac{1}{4}$ — 1-proz. Karbolsäurelösung das Gewebe tötete, so daß die Einimpfung des solchergestalt behandelten Gewebes ein völlig negatives Resultat gab, während dagegen eine $\frac{1}{8}$ -proz. Karbolsäure nach 5 Minuten langer Einwirkung nicht im stande war, das Geschwulstgewebe zu töten.

Die Geschwulstzellen werden also viel leichter durch Karbollösungen geschädigt als die in dieser Beziehung bisher untersuchten Scharotzer.

Tab. IX. Wirkung der Karbollösungen auf das Geschwulstgewebe.

Stärke der Lösungen	Dauer der Einwirkung	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh gestorbene Mäuse	Mäuse mit negativem Resultat	Mäuse mit positivem Resultat
1 Proz.	5 Minuten	5	—	5	0
$\frac{1}{5}$ "	5 "	4	—	4	0
$\frac{1}{4}$ "	5 "	2	2	2	0
$\frac{1}{8}$ "	5 "	4	—	1	3
	2 "	4	—	3	1
	1 Minute	4	2	2	0

Die Pyoktaninversuche wurden auf ganz dieselbe Weise ausgeführt. Zur Anwendung kam nur eine $\frac{1}{10}$ -proz. Lösung, deren Einwirkung das Gewebe 1, 2 und 5 Minuten lang ausgesetzt wurde. Die Versuche gaben ein ziemlich unsicheres Resultat und sind hier nur der Vollständigkeit wegen mitgenommen. Nach der

Tab. X. Wirkung der Pyoktaninlösungen auf das Geschwulstgewebe.

Stärke der Lösung	Dauer der Einwirkung	Anzahl der geimpften Mäuse	Zu früh gestorbene Mäuse	Mäuse mit negativem Resultat	Mäuse mit positivem Resultat
1 Promille	5 Minuten	4	1	3	0
1 "	5 "	4	—	3	1
1 "	2 "	4	—	2	1
1 "	2 "	4	—	4	0
1 "	1 Minute	4	1	3	0
1 "	1 "	4	—	4	0

1 Minute andauernden Einwirkung erschien in beiden Versuchsreihen negatives Resultat, während wir dagegen nach 2 Minuten langer Einwirkung in beiden Fällen einen einzelnen positiven Ausschlag erhielten. Der Grund, weshalb die Pyoktaninversuche ein so unsicheres Resultat gaben, ist wahrscheinlich in dem Umstande zu suchen, daß Pyoktanin die losgerissenen Zellen sehr schnell färbt, während es nur langsamer bis in die Mitte sogar ganz kleiner Gewebstücke eindringt, so daß ein geringer Unterschied der Größe derselben bei den einzelnen Versuchen auf den Ausfall entscheidenden Einfluß erhalten kann.

Fassen wir die Ergebnisse dieser verschiedenen Versuchsreihen zusammen, so sehen wir, daß das Geschwulstgewebe sich in allem Wesentlichen ziemlich so wie normale Epidermis und andere normale tierische Gewebe zu verhalten scheint, insoweit wir deren Widerstandsfähigkeit überhaupt kennen, daß dasselbe im ganzen aber doch etwas weniger widerstandsfähig zu sein scheint. Dagegen erweist sich ein bedeutender Unterschied zwischen der Widerstandsfähigkeit der Geschwulstzellen gegen die verschiedenen Einwirkungen im Vergleich mit der Widerstandsfähigkeit der Bakterien, der Blastomyceten und anderer Pflanzenschmarotzer, und schon dieser Umstand allein macht es höchst unwahrscheinlich, daß wir die Ursache einer Geschwulstbildung wie der vorliegenden in Pflanzenschmarotzern sollten finden können. Auch die in den letzten Jahren nachgewiesenen, der mikroskopischen Untersuchung

unsichtbaren Schmarotzer zeigen den verschiedenen hier in Betracht kommenden Einwirkungen gegenüber anderes Verhalten. So haben Marx und Sticker neuerdings einen derartigen Ansteckungsstoff als Ursache der beim Federvieh vorkommenden Geschwulstbildung Epithelioma contagiosum nachgewiesen und gefunden, daß derselbe im stande ist, ein längere Zeit andauerndes Eintrocknen zu ertragen, wie auch, daß er im Besitz einer sehr bedeutenden Resistenz gegen die Einwirkung der Wärme, der Kälte und des Sonnenlichtes ist und durch $\frac{1}{2}$ -stündige Einwirkung 1-proz. Karbolwassers nicht beeinflußt wird. Man darf deshalb wohl auch davon als wahrscheinlich ausgehen, daß auch diese Gruppe von Ansteckungsstoffen bei der Aetiologie dieser Geschwulst nicht in Betracht kommen kann. Dagegen ist es wahrscheinlich, daß nackte Amöben und ähnliche 1-zellige tierische Schmarotzer sich im wesentlichen auf ähnliche Weise gegen Erwärmung, Eintrocknen und vielleicht Abkühlung verhalten werden, wie die Geschwulstzellen meinen Untersuchungen zufolge dies tun, und es läßt sich deswegen wohl nicht von vornherein ausschließen, daß man derartige Schmarotzer als Erreger der Geschwulst finden könnte; die früher berührten Untersuchungen über den Verlauf der Transplantation wie auch das negative Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung sprechen aber entschieden dafür, daß auch keine solchen Schmarotzer vorhanden sind und die Ursache der Geschwulst repräsentieren.

Die Hauptresultate der hier referierten Untersuchungen sind in Kürze folgende:

- 1) Die Geschwulst zeigt einen entschieden carcinomatösen Bau, gibt jedoch keine Metastasen. Sie setzt stets ihr Wachstum fort, bis die Maus an Kachexie oder infolge einer Durchulceration der Haut stirbt.
- 2) Die Geschwulst ließ sich bis jetzt 19 Generationen hindurch auf weiße Mäuse übertragen; die Uebertragungen gelangen bei 40—50 Proz. der geimpften Tiere. Die Uebertragung auf graue Mäuse glückte; es wird aber nur eine geringere Anzahl derselben nach Impfung angegriffen. Auf keine andere Tierart ist die Geschwulst übertragbar.
- 3) Die Uebertragung ist eine einfache Transplantation; das einfache Zerquetschen der Geschwulstzellen vor der Einimpfung bewirkt ein negatives Resultat der Impfversuche. Es kommen bei einigen Mäusen im Geschwulstgewebe Pseudoschmarotzer vor. Ein Anhaltspunkt für die Annahme einer parasitären Entstehung der Geschwulst wurde nicht gefunden.
- 4) Das Geschwulstgewebe vermag sich in isoliertem Zustande bei einer Temperatur von 1—3° ca. 18 Tage, bei Zimmertemperatur ca. 12 Tage lang lebend zu erhalten, während es bei Körpertemperatur kaum 24 Stunden leben bleibt.
- 5) Das Geschwulstgewebe wird durch 5 Minuten dauernde Erwärmung auf 47° und durch die wenige Minuten dauernde Einwirkung von \div 20° getötet. Ebenfalls wird es leicht durch intensives Licht getötet, die Lichtstrahlen können aber nur bis zu sehr geringer Tiefe ins Gewebe eindringen. Partielles Eintrocknen wirkt gleichfalls tödend, und eine $\frac{1}{4}$ -proz. Karbollösung vermag im Laufe von 5 Minuten die Lebensfähigkeit der Zellen aufzuheben.

Erklärung der Tafeln.

- Fig. 1. Graue Hausmaus mit Tumor, vor $2\frac{1}{4}$ Monaten geimpft.
 Fig. 2. Weiße Maus mit lappigem Tumor. Die Haut am Rücken entfernt. Vor ca. 2 Monaten geimpft.
 Fig. 3. Schnitt einer jüngeren Geschwulst. Kleinere Krebsalveolen. Die schwarzen Körperchen sind Mitosen.
 Fig. 4. Schnitt einer etwas älteren Geschwulst. Größere Krebsalveolen, in deren Innerem die Zellen stark zerfallen sind. Spärliches Bindegewebe.
 Fig. 5. Transplantiertes Geschwulststückchen 2 Tage nach der Uebertragung. Die Krebszellen größtenteils zerfallen (a), an einigen Stellen zum Teil erhalten (b). Wegen des Zerfalls und der beginnenden Resorption der Zellmasse ist das Gewebe eingefallen und die Bindegewebszüge scheinen verdickt. Schwache Vergrößerung.
 Fig. 6. Transplantiertes Gewebstückchen 4—5 Tage nach der Uebertragung. Bei a Haufen teilweise erhaltener Krebszellen; bei b ein Riß des Gewebes als Ueberbleibsel einer Krebsalveole, deren Inhalt resorbiert ist. Nur die Bindegewebsmasse hat sich erhalten. Schwache Vergrößerung.
 Fig. 7. Transplantiertes Gewebstückchen 6—7 Tage nach der Uebertragung. Das Gewebe mit den Umgebungen verwachsen. Bei a Ueberreste des eingeführten, jetzt hyalin umgebildeten Bindegewebes. b neugebildetes Bindegewebe. Das Krebsgewebe völlig resorbiert, mit Ausnahme kleiner proliferierender Zellenhaufen (c). Schwache Vergrößerung.
 Fig. 8. Transplantation. Hanfkorngroßer Tumor 9—10 Tage nach der Uebertragung. Schwache Vergrößerung.
 Fig. 9. Transplantation. 2 Tage nach der Impfung. Das Gewebe zerfallen, einzelne Zellenhaufen erhalten. Stark vergrößert.
 Fig. 10. Transplantation. 6—7 Tage nach der Uebertragung. Proliferierende Zellenhaufen (siehe Fig. 7 c). Stark vergrößert.
 Fig. 11. Krebszelle mit eingeschlossenen roten Blutkörperchen.
 Fig. 12. Pseudoschmarotzer. Große, runde, homogene, zum Teil intracelluläre Körper.
 Fig. 13. Pseudoschmarotzer. Rundliche Körper mit kernähnlichen Bildungen.
 Fig. 14. Pseudoschmarotzer. Zerstreute, rundliche Körper; in einer Krebszelle ein wenig oberhalb der Mitte ein großer, runder Körper mit mehreren kugelförmigen, dunkelfarbigem „Pseudosporen“.
 Fig. 15. Keratohyalin degenerierte Krebszellen (dunkel), zwischen den gewöhnlichen Krebszellen gelegen. Bei a eine sichelförmig gebogene, degenerierte Zelle, unmittelbar an einer normalen Krebszelle liegend. Bei b ein rotes Blutkörperchen.
 Fig. 16. Bei a eine von 2 gekrümmten, keratohyalin umgebildeten Zellen umschlossene Krebszelle (beginnende Pseudococcidienbildung).
 Die Mikrophotographien sind nicht retouchiert; nur an Fig. 2 sind 2 schwarze Flecken weggenommen. Sämtliche Präparate sind in Zenkers Flüssigkeit fixiert und nach van Gieson gefärbt.

Literatur.

- 1) Hanau, Erfolgreiche Uebertragung von Carcinom. (Fortschr. d. Med. Bd. VII. 1889. p. 321.)
- 2) Morau, Recherches expérimentales sur la transmissibilité de certains néoplasmes. (Arch. de méd. expér. et d'anat. pathol. T. VI. 1894. p. 677.)
- 3) Loeb, a) On transplantations of tumors. (Journ. of med. research. Vol. VI. 1901. p. 28. — b) Virch. Arch. Bd. CLXVII. p. 175.)
- 4) Velich, Beitrag zur Frage nach der Uebertragung des Sarkomes. (Wien. med. Blätter. 1898. p. 711 u. 729. — Ref. Baumgartens Jahrbuch. 1898.)
- 5) Jensen, C. O., Forsøg med Kræftsvulster. (Biologisk Selskabs Forhandling. København 1901—02. p. 6.)
- 6) — —, Forsøg med Muscancer. (l. c. p. 20.)
- 7) — —, Nogle Forsøg med Kræftsvulster. (Hospitalltidende. 1902. No. 19.)
- 8) v. Leyden u. Blumenthal, Vorläufige Mitteilungen über einige Ergebnisse der Krebsforschung auf der 1. medizinischen Klinik. (Deutsche med. Wochenschr. 1902. p. 637.)
- 9) Livingood, Tumors in the mouse. (The John Hopkins Hospital Bulletin. 1896. No. 66—67.)
- 10) Borrel, a) Les theories parasitaires du cancer. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. p. 49.) — b) Epithélioses infectieuses et epithéliomas. (Ibid. T. XVII. 1893. p. 112.)

- 11) Pianese, G., Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms. (Zieglers Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. 1896. 1. Suppl.-Heft.)
- 12) Wentscher, J., Wie lange und unter welchen Umständen bleibt die Lebensfähigkeit der menschlichen Epidermiszellen außerhalb des Organismus erhalten? (Centralbl. f. Chir. 1898. No. 1.)
- 13) Ljunggren, Om hudepitelets förmåga att utanför människeorganismen kunna bibehålla lifvet, med särskild hänsyn till hudtransplantation. (Nordisk med. Arkiv. 1998. No. 8.)
- 14) Morpurgo, Die Vita propria der Zellen des Periosts. (Virch. Arch. Bd. CLVII. p. 172.)
- 15) Finsen, N. R., La photothérapie 1899. (Meddelelser fra Finsens medicinske Lysinstitut. Bd. IV. Köbenhavn 1902. p. 32.)
- 16) Jansen, Hans, Undersøgelser over de baktericide Lysstralers Evne til at traenge gennem Huden. (Meddelelser fra Finsens medicinske Lysinstitut. Bd. V. Köbenhavn 1903. p. 44.)

Nachdruck verboten.

Zum Streit um den Meningococcus.

Von Prof. H. Bonhoff in Marburg a. L.

Die im Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. 1903. No. 1 u. 7 geführte Kontroverse zwischen Weichselbaum und Albrecht und Ghon einerseits, H. Jaeger andererseits gibt mir Gelegenheit, einen Irrtum der Herren Albrecht und Ghon richtig zu stellen, der sich schon in ihrer ersten Arbeit in der Wien. klin. Wochenschrift. No. 41. p. 18 des Sonderabdruckes findet und in der Arbeit H. Jaegers sowohl wie der Entgegnung Albrecht und Ghons im Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXXIII wiederkehrt. Nachdem Albrecht und Ghon unter den biologischen Merkmalen des Meningococcus auf p. 9 des Sonderabdruckes auch die Bildung einer Kahlhaut in Fleischbrühe erwähnt haben, folgt auf p. 18 der Satz: „Ebenso kann der Umstand, daß die Kahlhautbildung in Fleischbrühekultur niemals erwähnt wird, nicht dazu herangezogen werden, die von den erwähnten Autoren beschriebenen Kokken als andere Arten hinzustellen. Eine Erklärung für das Nichtbeobachten dieses kulturellen Merkmales haben wir bereits oben zu geben versucht.“

H. Jaeger sagt in seiner Streitschrift zur Frage der morphologischen und biologischen Charakterisierung des Meningococcus intracellularis auf p. 27: „Mit der Behauptung, daß Kahlhautbildung zu den charakteristischen Merkmalen der Meningokokken gehöre, stehen Albrecht und Ghon ganz isoliert. Wie meine Tabelle p. 128—131 zeigt, ist diese Erscheinung nicht einmal von denjenigen Forschern beobachtet worden, deren Untersuchungen vor den Augen der Herren Albrecht und Ghon Gnade gefunden haben.“

Und in ihrer Entgegnung hierauf lassen sich auf p. 504/505 Albrecht und Ghon dahin vernehmen: „Zu Punkt 5, der die allerdings neue Beobachtung der Kahlhautbildung in Fleischbrühekulturen bringt, beschränkt sich Jaeger auf die Bemerkung, daß wir mit dieser Beobachtung isoliert dastehen. Er verspricht darauf zurückzukommen, was aber nicht geschieht. Dem darüber in unserer Arbeit vom Jahre 1901 Gesagten haben wir hinzuzufügen, daß auch alle inzwischen neu erhaltenen Stämme diese Eigentümlichkeit . . . zeigen. . . Wir können Herrn Jaeger übrigens die Versicherung geben, daß wir mit der Beobachtung dieser Eigentümlichkeit auch nicht mehr isoliert dastehen etc.“

Nicht weil mir diese Angelegenheit von großer Wichtigkeit schiene, sondern zur Feststellung einer unzweifelhaften Tatsache will ich hier einige Sätze aus meiner Arbeit: „Ueber einen Fall von Cerebrospinalmeningitis und den *Diplococcus intracellularis*“ anführen, zumal ich zu denen gehöre, die vor den Herren Albrecht und Ghon Gnade gefunden haben. Auf p. 5 des Sonderabdruckes, p. 90 der Münch. mediz. Wochenschrift. 1901. No. 3 (15. Januar) ist zu lesen: „Vor allem die flüssigen Nährböden . . . zeigten in überraschend schneller und häufiger Weise die Eigentümlichkeit des Meningococcus, auf künstlichem Nährboden rasch abzusterben. Meist ließ sich schon von der 1. Generation auf flüssigem Nährboden, die vom Agar geimpft war, eine 2. Generation in flüssigem Materiale nicht mehr erzielen. Die Bouillon trübte sich meist gar nicht, selten nur ganz gering. Die 3. Generation — immer bei 2-tägiger Abimpfung — blieb immer aus und man mußte von neuem vom Agar abimpfen, um flüssige Kulturen zu erhalten. Es gelingt nun aber doch auch, auf flüssigem Nährmateriale fortdauernde Kulturen zu erhalten, wenn man dafür sorgt, daß das übergeimpfte Material an der Oberfläche der Flüssigkeit haften bleibt. Bringt man von dem auf dem Agar befindlichen Kulturmateriale etwas an die Wand des Reagenzglases an der Stelle, an welcher sich beim Stehen der Röhrchen im Brütschranke der Rand der Flüssigkeitsoberfläche befindet, so sieht man, daß sich in 24—48 Stunden ein zerbrechliches graues Häutchen auf der Oberfläche der Nährlösung entwickelt, das allerdings sehr die Neigung hat, beim geringsten Schütteln in einzelnen Brocken zu Boden zu sinken. Außerdem sieht man die Bouillon in toto getrübt und einen ziemlichen Bodensatz von grauem Materiale. Von dem erwähnten Häutchen auf neues flüssiges Nährmaterial übertragene Stücke lassen unter allen Umständen, wenn man dafür sorgt, daß die Stückchen wenigstens zum Teil an der Oberfläche bleiben, eine neue Kultur aufgehen; man braucht sogar nur etwa jeden 4. Tag abzuimpfen. Später allerdings findet man auf den Ausgangsröhrchen meist keine Hautstückchen mehr.“

Da die Herren Albrecht und Ghon doch, wie sie bewiesen haben, sehr aufmerksam zu lesen verstehen, wundert es mich, daß ihnen dieser Passus meiner $\frac{3}{4}$ Jahr vor der ihrigen erschienenen und von ihnen zitierten Arbeit entgangen ist.

Marburg, 27. März 1903.

Nachdruck verboten.

Zur Kenntnis des Tropicaparasiten (*Plasmodium praecox* Gr. u. Fel).

Die Tüpfelung der Wirtszellen der Halbmonde.

Von Prof. P. Argutinsky, Kasan.

Mit 1 Tafel.

In meiner letzten Mitteilung über das *Plasmodium vivax* Gr. u. Fel. ¹⁾ habe ich eine Methode beschrieben, um Malariaparasiten lebend, also

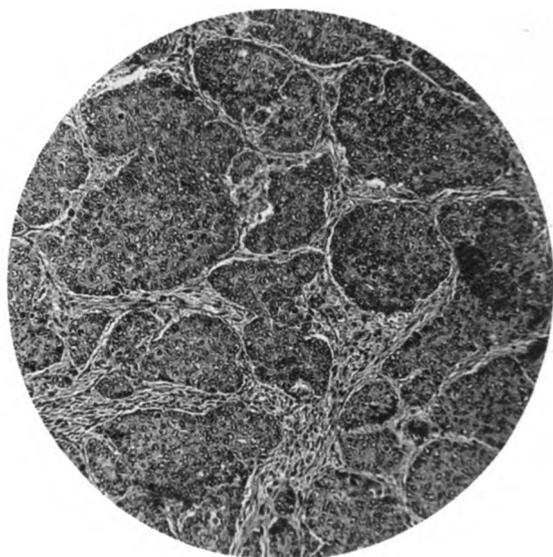
1) Malariastudien. Zweite Mitteilung. (Archiv f. mikrosk. Anat. Bd. LXI. 1902).



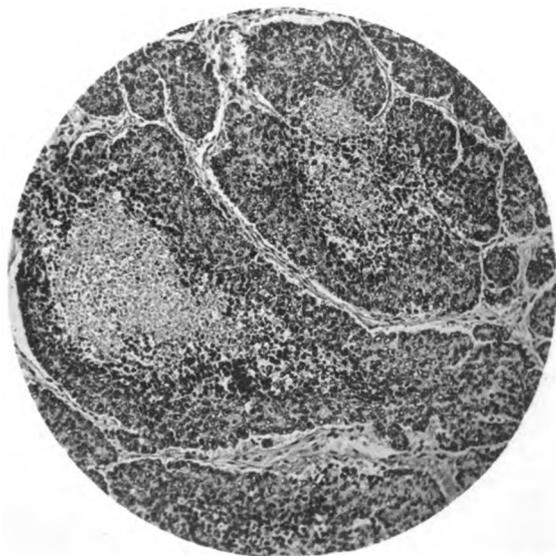
Fig. 1.



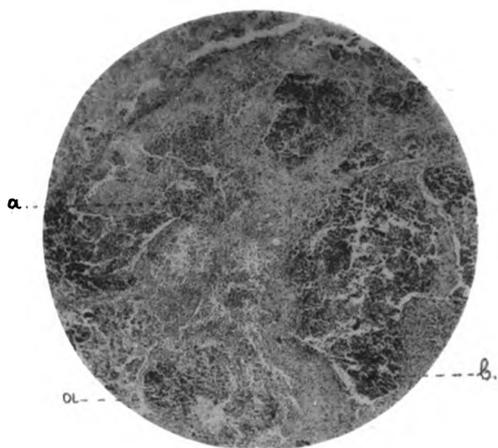
Fig. 2.



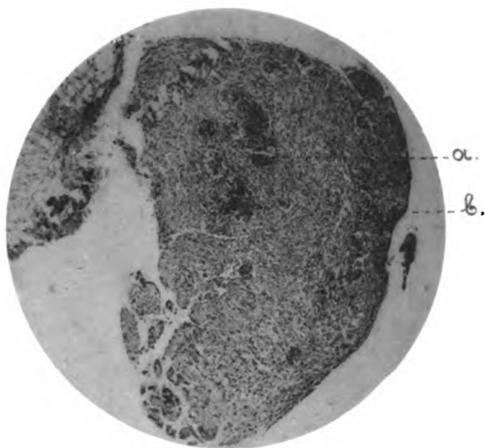
3.



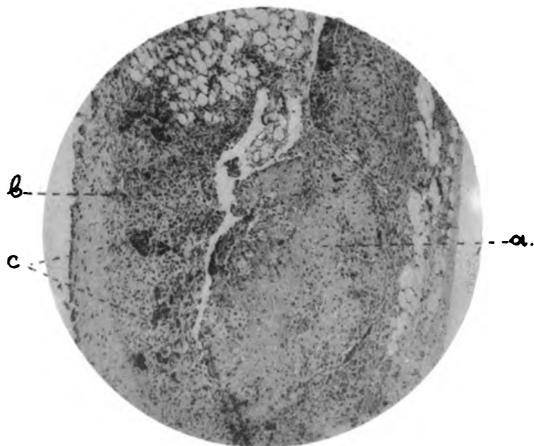
4.



5.



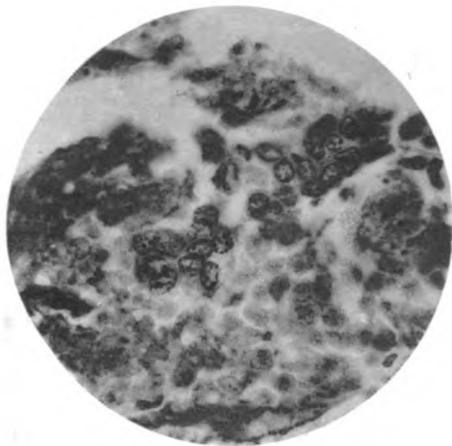
6.



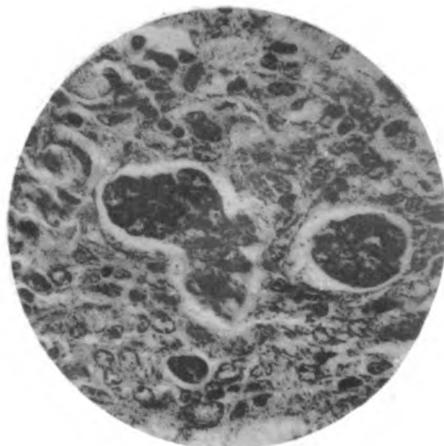
7.



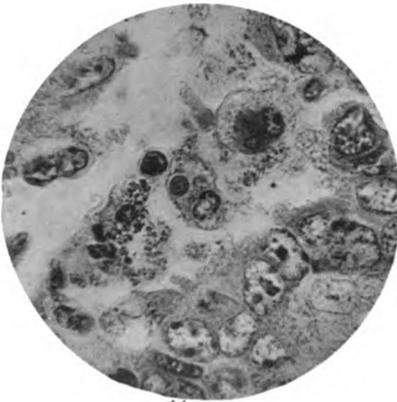
8.



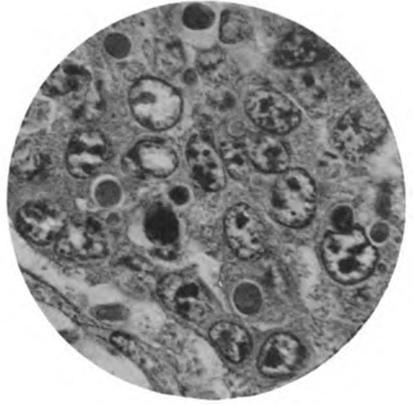
9.



10.



11.



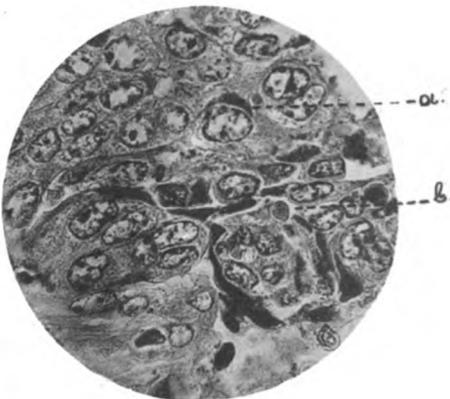
12.



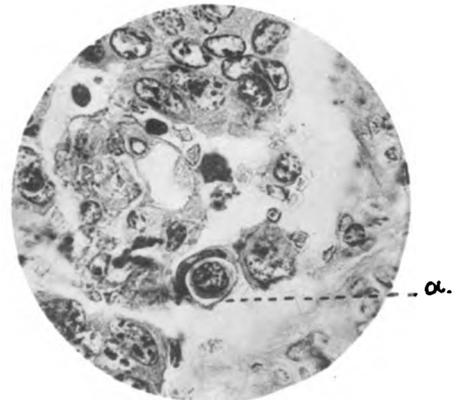
13.



14.



15.



16.

im frischen, flüssigen Blute, zu fixieren¹⁾ und zur Färbung der so gewonnenen Präparate nur altes, längere Zeit im Zimmer gestandenes Sodamethylenblau (und Eosin) empfohlen.

Die erhaltenen Resultate machten es wünschenswert, die angegebene Methode auch bei anderen Malariaparasiten zu versuchen. Eine besonders günstige Gelegenheit zum Studium des Tropicaparasiten wurde mir in den verflochtenen Herbst- und Wintermonaten geboten, da ich eine Reihe von leichten Tropicacrankungen (bei Kindern) in längerer Beobachtung hatte. Ich will in den folgenden Zeilen über ein Ergebnis dieser Studien kurz berichten:

Durchmustert man ein, nach obiger Methode gewonnenes Tropicapreparat, so fällt, falls es Gameten enthält, eine interessante und unerwartete Tatsache auf: Die halbmondtragenden Blutkörperchen zeigen nämlich eine ausgesprochene Tüpfelung ihres freien, den Halbmond umgebenden Randes; sie sind mit denselben Tüpfeln besetzt, wie solche, seit Schüffners Entdeckung, an den mit Tertianaparasiten infizierten Blutzellen allgemein bekannt sind²⁾.

1) Weitere Versuche mit dieser Methode haben ergeben, daß es von bedeutendem Vorteil ist, zur Räucherung eine etwas größere Menge Essigsäuregemisch, im ganzen etwa 20 Tropfen (16—24 Tropfen) zu nehmen, die Präparate etwa 20—30 Minuten mit Wasserstoffsuperoxydlösung zu behandeln und das Auswaschen (nach H_2O_2) 12—24 Stunden dauern zu lassen, bei mehrmaligem Wechseln des Wassers.

2) In einer im November v. J. erschienenen Arbeit [Die Malaria perniciosa. (Centrabl. f. Bakt. I. Abt. Originale. Bd. XXXII. 1902. No. 10)] berichtet Maurer über eine eigentümliche Veränderung mancher infizierter Blutkörperchen bei der Tropicacrankung. Er findet bei den „großen Ringen“ und reifen Formen der Tropicaschizonten an den von ihnen befallenen Blutkörperchen „eine Anzahl intensiv roter Flecken“. Er sagt: „Die Anzahl dieser Flecken ist in verschiedenen Blutkörperchen verschieden groß; neben solchen, die nur 1, 2 oder mehr tragen, finden wir andere, welche reichlich damit ausgestattet, immer jedoch ist ihre Zahl eine leicht zählbare.“

Diesen Flecken werden von Maurer die Tertiantüpfel gegenübergestellt. Von ihnen (den Tertiantüpfeln) wiederholt er auch in dieser Arbeit: „Sie erscheinen von Anfang an durch die ganze Blutscheibe verteilt als feine Tüpfel; sie wachsen mit dem Größerwerden des Blutkörperchens resp. mit dem des Parasiten, nicht an Zahl, sondern an Masse.“ Im Gegensatz hierzu heißt es von den Flecken der Tropicacrankung: „Während an den, von kleinen Ringen bewohnten Blutkörperchen nichts zu beobachten auffiel, sehen wir die Flecken erscheinen, sobald die Parasiten größer werden, und zwar sind sie spärlicher oder zahlreicher auf einem Blutkörperchen, je nachdem der Parasit kleiner oder größer ist; daraus geht hervor, daß die Flecken nicht auf einmal auftauchen, sondern einer nach dem anderen entstehen, ein ganz prinzipieller Unterschied von der Entstehung der Tüpfelung beim Tertianparasiten.“

Die Tropicaflecken beschreibt Maurer folgendermaßen: „als Punkte, feinste Ringelchen, als Schleifen und Streifen vorherrschend sind die kleinen Ringelchen“*). Er erklärt die Flecken als oberflächliche Substanzverluste des Blutkörperchens, verursacht durch den Tropicaparasiten. Er meint: „Wir müssen die beschriebenen, in unseren Präparaten rot gefärbten Punkte, Ringelchen, Striche betrachten als Substanzveränderungen resp. -verluste auf der Oberfläche des Erythrocyten, die eine Folge sind von Angriffen des Parasiten, welche dieser unternimmt, um sich an seinem Träger festzuhalten, oder sich Nahrung zu verschaffen so lange er (der Tropicaparasit) klein ist, sind seine Ansprüche gering, und die Verletzungen, die er seinem Wirt beibringt, dementsprechend unbedeutend und für uns nicht sichtbar; mit seinem Wachstum ändert sich beides und die letzteren werden so eingreifend, daß wir im stande sind, sie durch Färbung nachzuweisen.“

*) Solche Ringelchen, und zwar in den nämlichen Entwicklungsstadien des Tropicaschizonten hat bereits Schüffner [Beitrag zur Kenntnis der Malaria. (Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. LXIV. 1899)] gesehen und abgebildet. Man vergleiche die Figg. 8—15 bei Maurer mit der Fig. 29 bei Schüffner. Letzterer hielt diese Ringelchen ebenso wie die Tüpfelung des Tertianparasiten für „Ausscheidungsprodukte“ oder „abgeschnürte Teile“ des Parasiten.

Da hier, in Kasan, keine schweren, perniciosen Tropicakerkrankungen zu beobachten sind, so finde ich im peripherischen Blute der Tropicakranken entweder nur Halbmonde oder Halbmonde und „Ringe“, seltener „Ringe“ allein, dagegen keine mittelgroßen und erwachsenen Tropicaschizonten.

Bei den jungen Formen, den sogenannten „Ring“en, habe ich nie eine Tüpfelung der von ihnen infizierten Erythrocyten wahrnehmen können. Ueber das Verhalten der Blutkörperchen, welche mit mittelgroßen oder reifen Tropicaschizonten behaftet sind, kann ich dagegen nichts berichten, weil ich nie eine Milzpunction gemacht und auch nie einen Todesfall bei Tropica begegnet bin.

In einem nach der oben erwähnten Methode fixierten und sorgfältig mit altem Sodamethylenblau (und Eosin) gefärbten Tropicablutpräparat ist die Tüpfelung der halbmondtragenden Erythrocyten — die Tropicatüpfelung — mit einer Schärfe und Prägnanz zu beobachten, die nichts zu wünschen übrig läßt, aber sie tritt nur dann hervor, wenn das Präparat intensiv gefärbt wird. Bei einer schwachen, ungenügenden Färbung fehlt sie dagegen ganz, wie es auch bei der Darstellung der Tertianatüpfelung nach der gewöhnlichen Methode der Fall ist. Während aber die Tertianatüpfelung so leicht bei der üblichen Fixierung und bei Färbung mit wenig gereiftem Sodamethylenblau nachzuweisen ist, habe ich bis jetzt an den im Alkohol, Alkoholäther oder Sublimat fixierten, getrockneten Tropicablutausstrichen, welche allerdings mit nur wenigen Wochen altem Sodamethylenblau gefärbt wurden, nichts von einer Tüpfelung der Wirtszellen der Halbmonde wahrnehmen können¹⁾. Es scheint auch allen anderen Beobachtern ebenso ergangen zu sein²⁾.

Gerade bei den Gameten — sowohl bei Jugendformen als auch bei reifen Halbmonden — findet Maurer diese Flecken nie, und sucht hierfür eine Erklärung (in Uebereinstimmung mit seiner Theorie der Fleckenbildung) darin, daß „der Tropicagamet während seines Wachstums sich passiv verhält, keine amöboiden Bewegungen ausführt und das Blutkörperchen selbst nicht angreift.“ Mehrmals betont er das Fehlen der Flecken bei den Gameten. So sagt er an einer Stelle: „Ich betone nochmals, daß der freie Teil des Blutkörperchens bei allen diesen Formen, d. h. bei den Gameten, stets vollkommen fleckenlos ist.“ (Gesperrt im Original.)

Aus dem Angeführten ersieht man, daß Maurer die bei „großen Ringen“ und reifen Schizonten des Tropicaparasiten von ihm beobachteten Flecken als kleine Ringelchen, Streifen, Schleifen etc. beschreibt und abbildet, und auf das bestimmteste behauptet, daß sie bei den Halbmonden ausnahmslos fehlen und nie beobachtet werden.

Nun, da es mir gelungen, bei den halbmondtragenden Blutkörperchen eine unzweifelhafte Tüpfelung nachzuweisen, welche sich als eine der Tertianatüpfelung ganz analoge erwiesen hat, so liegt es nahe, jene von Maurer in „großen Ringen“ und reifen Schizonten beobachteten Flecken ebenfalls als Tüpfelung aufzufassen. Hiermit wird Maurers Auffassung, daß seine Flecken „Verluste auf der Oberfläche der Erythrocyten, infolge von Angriffen von Parasiten“, seien, unhaltbar und muß der Ansicht weichen, daß man es mit derselben Erscheinung zu tun hat, wie bei der Tertianatüpfelung, die allgemein als Folge der Einwirkung des Parasiten auf den ganzen Erythrocyten aufgefaßt wird³⁾.

1) Ich behalte mir vor, nachzuweisen, ob nicht auch in den so fixierten, getrockneten Tropicalblutausstrichen mit altem, stark gereiftem Sodamethylenblau die oben beschriebene Tüpfelung der Halbmonde zu erhalten ist. Wahrscheinlich ist das der Fall.

2) Auch die Autoren, welche an lebenden Tropicaparasiten gearbeitet haben, berichten nichts von einer Tüpfelung der halbmondtragenden Blutzellen.

*) Es sei mir hier gestattet, zugleich der Vermutung Ausdruck zu geben, daß die von Maurer an der Hand der stark tingierten Präparate beschriebene „Kapsel des Halbmondes“ ein Kunstprodukt, eine Folge von Ueberfärbung ist, und daß sie sich beim vorsichtigen Ausziehen der Farbe als getüpfelter Saum erweisen wird, eben, als die von mir beschriebene Tüpfelung des Erythrocyten im Umkreise des Halbmondes.

Entgegen der häufigen Angabe, daß die Jugendstadien der Halbmonde nur bei schwerer Tropicainfektion im peripherischen Blute gefunden werden, waren in mehreren unserer ganz leichten Tropicafälle (bei Kindern) außer den reifen Halbmonden auch ihre Entwicklungsstadien zu beobachten, allerdings keine Frühstadien.

In unseren Dauerpräparaten weisen alle Halbmonde eine so ausgezeichnete Kernfärbung, eine so scharfe Differenzierung der Protoplasmafärbung bei beiden Arten von Gameten auf, daß man in allen vorkommenden Stadien der Entwicklung die weiblichen und die männlichen Gameten stets auf den ersten Blick unterscheiden kann. Die Tüpfelung ist bei weiblichen Halbmonden, bei reifen wie bei unreifen, fast stets viel mehr in die Augen springend als bei männlichen, zum Teil gewiß deshalb, weil der Erythrocytensaum um den schmäleren, weiblichen Halbmond etwas breiter ist, während er beim breiteren männlichen Halbmond ganz fein ausfällt.

Die reifen männlichen Halbmonde sind kürzer und breiter, haben weniger verschmälerte Enden als die weiblichen, besitzen ein hyalines, blaßbläulich gefärbtes, manchmal fast farbloses Protoplasma und einen großen, länglichen, oft höckerigen, leuchtend karminrot gefärbten Kern, der den größten Teil des Halbmondes einnimmt und auf dessen Oberfläche die Pigmentkörner sitzen. Der Erythrocytensaum ist, wie bereits erwähnt, fast immer schmaler, als beim weiblichen Halbmond und enthält meist nur eine 1-reihige Tüpfelung um den Halbmond, auch sind die Tüpfeln feiner und weniger intensiv gefärbt als beim weiblichen Gameten.

Die reifen weiblichen Halbmonde erscheinen mit einem dunkleren, gesättigt blaugefärbten Protoplasma, das an den Enden noch dunkler gefärbt ist und in guten Präparaten häufig einen alveolären Bau zeigt. Der weibliche Gamet ist schmaler, gewöhnlich etwas länger als der männliche und meist ein wenig eingebogen; auch haben die weiblichen Halbmonde einen breiteren Erythrocytensaum. Der kleine runde oder ovale karminrot gefärbte Kern, der zuweilen eine leicht granulierende Oberfläche darbietet, ist von Pigmentkörnchen oder -stäbchen besetzt, die entweder gleichmäßig auf demselben verteilt oder mehr an einem Kernpol angehäuft sind. Die Lage dieses Kernes im Halbmonde ist eine verschiedene, am häufigsten eine zentrale oder dem einen Ende des Halbmondes etwas genähert, seltener liegt der Kern ganz nahe an einem Zellende. In anderen wenigen Fällen schmiegt er sich, gleich entfernt von beiden Halbmondenden, der konvexen Längsseite des Halbmondes an.

Der Erythrocytensaum um den weiblichen Halbmond zeigt bei starker Färbung des Präparates eine ausgesprochene rotviolette Tüpfelung. Der Saum selbst hat eine blässere, manchmal viel blässere Farbe als die nicht infizierten Erythrocyten, ja er kann fast entfärbt sein. Die rotviolett gefärbten Tüpfel sind ziemlich zahlreich, gewöhnlich unregelmäßig im Saum verteilt und weisen keine auffallenden Größenunterschiede auf. In Blutpräparaten, deren Färbung dunkler als sonst ausgefallen ist, in denen die nicht infizierten Erythrocyten einen bläulichen Farbenton angenommen haben und auch das Protoplasma der weiblichen Halbmonde eine gesättigtere Blaufärbung als sonst zeigt, hebt sich die Umsäumung des Halbmondes mit rotvioletten Tüpfeln außerordentlich scharf hervor. Sind auch in den meisten Fällen die Tüpfel auf den Erythrocytensaum beschränkt, so trifft man hie und da auch weibliche Halbmonde, an denen außerdem noch zahlreiche Tüpfel über dem

Halbmond selbst nachzuweisen sind, allerdings meist nicht ganz so zahlreich.

Vergleicht man im mikroskopischen Bilde die Tropic- und Tertianatüpfelung miteinander, so überzeugt man sich bald von der großen Aehnlichkeit derselben. Eigentümlich ist aber ihr oben erwähntes verschiedenes Verhalten gegenüber der Färbung mit Sodamethylenblau und Eosin, was besonders augenfällig wird, wenn in einem und demselben Malariablutpräparat Tertianaparasiten und zugleich auch Tropicagameten vorhanden sind. Stellt man in einem solchen Präparat durch gewöhnliche Fixierung und Färbung die Tertianatüpfelung dar, so zeigt sich hierbei keine Spur einer Tüpfelung um die Halbmonde. Fixiert man dagegen solches Blut ganz frisch und noch flüssig nach der oben erwähnten Methode, färbt es mit sehr altem Sodamethylenblau (und Eosin) und stellt so die Tropicatüpfelung dar, so ist dann wiederum von der Tertianatüpfelung nichts zu sehen, weil sie sich nun bereits entfärbt hat. Die Tropicatüpfel färbt sich also schwerer als die der Tertiana, aber einmal gefärbt, halten sie bei Differenzierung der Färbung mit saurem Alkohol die Farbe stärker zurück und entfärben sich schwerer als die Tertianatüpfel, was vielleicht mit der Aufquellung der von Tertianparasiten befallenen Erythrocyten und der etwaigen Schrumpfung der Blutzellen bei Tropicainfektion im Zusammenhang stehen mag.

Zum Schluß möchte ich noch die Bemerkung hinzufügen, daß nun sorgfältig zu untersuchen wäre, ob beim dritten menschlichen Malaria-Parasiten, dem *Plasmodium malariae* Lav., ebenfalls eine Tüpfelung nachzuweisen ist oder ob der Quartanaparasit in dieser Hinsicht, gegenüber den anderen zwei Parasiten, einen auffallenden Unterschied zeigt. In jedem Falle wird ein entscheidendes Ergebnis einer solchen Untersuchung auch theoretisch von großem Interesse sein.

Erklärung der Abbildungen.

Die Figg. 10—15, welche Tertianaparasiten darstellen, sind mit in die Tafel aufgenommen, um die Differenzierung der verschiedenen Arten von Parasitenzellen der Tertiana durch die jetzt etwas modifizierte Essigsmiumsäuremethode zu zeigen. Das verschiedene färberische Verhalten des Protoplasmas beim Schizonten, Makrogameten und Mikrogametocyten wird durch diese Methode besonders deutlich zum Ausdruck gebracht. Vor allem ist hervorzuheben, wie außerordentlich scharf das Protoplasma des Makrogameten, dessen Eigentümlichkeiten ganz besonders von Schaudinn¹⁾ genau ermittelt und beschrieben sind, sich bei dieser Methode vom Protoplasma des Schizonten unterscheidet, während dieser Unterschied bei der üblichen Untersuchungsmethode der Malariaparasiten meist recht undeutlich oder gar nicht ins Auge fällt.

Untersuchungsmethode: Fixierung der noch flüssigen Blutaustriebe in Dämpfen des Essigsmiumsäuregemisches während einer halben Minute. Trockenwerdenlassen. Behandeln der Ausstriche mit officineller Wasserstoffsperoxydlösung 30 Minuten lang und Auswaschen während 12—24 Stunden mit einigemal gewechseltem destilliertem Wasser. Färben mit altem Sodamethylenblau und Eosin. Differenzierung mit angesäuertem Alkohol.

Zeiss, Apoch. homog. Imm. 2 mm, Komp.-Ocul. 18. Vergrößerung ca. 2250. Abbes Zeichenapparat.

Fig. 1, 2, 3. Junge männliche Halbmonde mit feiner Tüpfelung des schmalen Erythrocytensaumes.

1) Ueber den Generationswechsel der Coccidien und die neuere Malariaforschung. (Sitzungsberichte Ges. naturf. Freunde Berlin. 1899.) — Der Generationswechsel der Coccidien und Hämosporidien; eine Zusammenfassung der neueren Forschungsergebnisse. (Zool. Centralbl. Bd. IV. 1899.) — Studien über krankheitserregende Protozoen. II. *Plasmodium vivax* (Gr. et Fel.). (Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XIX. 1902. Heft 2.)

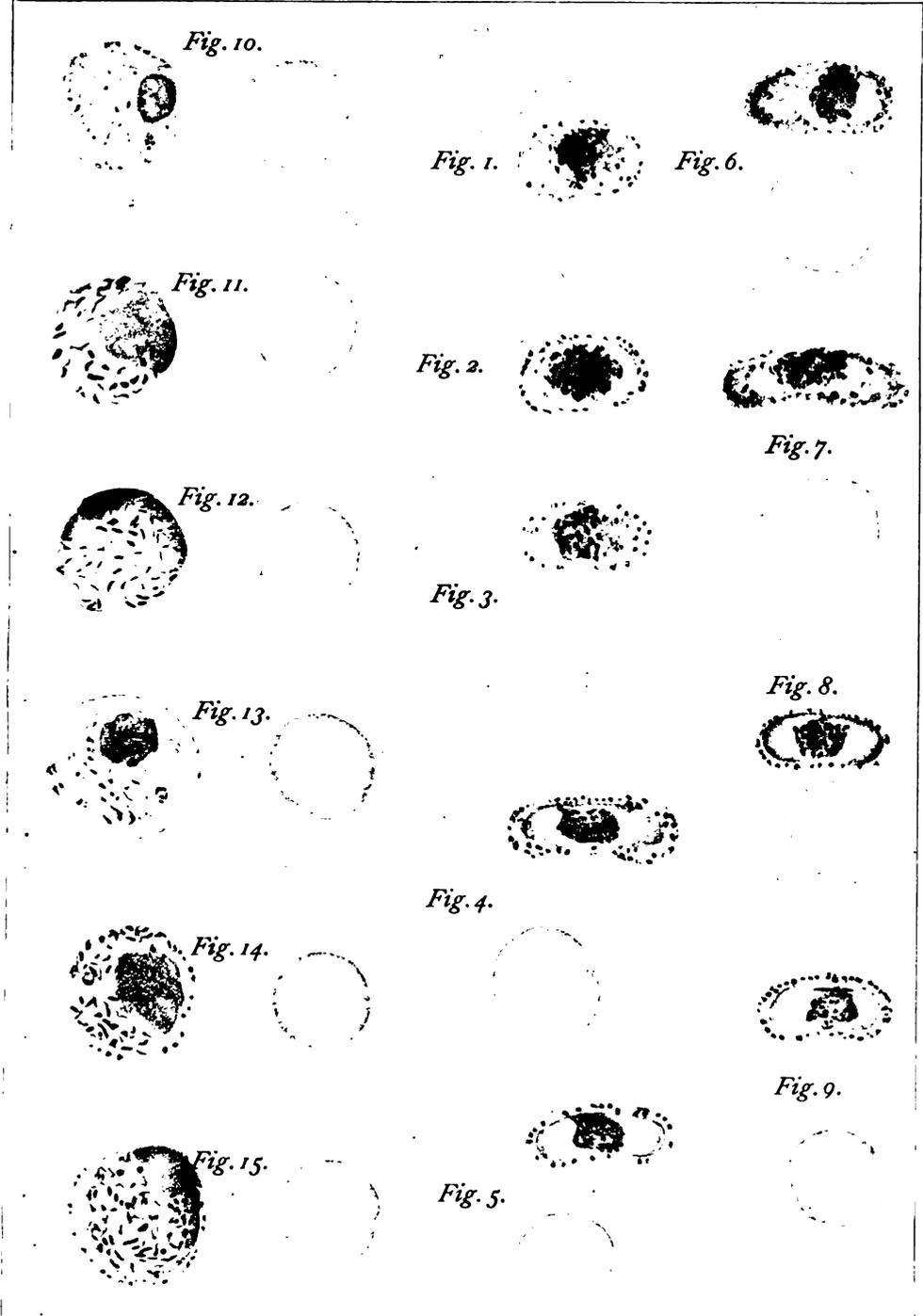


Fig. 4, 5. Reife weibliche Halbmonde mit Tüpfelung des Erythrocytensaumes.

Fig. 6. Weiblicher Halbmond. Tüpfelung um und über denselben.

Fig. 7 ebenso wie Fig. 6, aber die Tüpfelung ist im Präparat nicht gut ausgeprägt.

Fig. 8, 9. Weibliche Halbmonde mit Tüpfelung des Erythrocytensaumes.

Fig. 10. Junger amöboider Tertianaschizont.

Fig. 13. Reifer Tertianaschizont.

Fig. 11, 14. Tertianamikrogametocyten.

Fig. 12, 15. Tertianamakrogameten.

An der Fig. 15 sieht man eine scharf ausgesprochene Tertianatüpfelung, die ganz denselben Charakter zeigt, wie die Tropicatüpfelung. Man vergleiche diese Figur namentlich mit den Figg. 4 und 5.

Die Figg. 10, 11, 12 sind einem und demselben Blutausstrich entnommen, einem anderen die Figg. 13, 14, 15.

Jedem infizierten Erythrocyten ist ein nicht infiziertes rotes Blutkörperchen beigegeben, als Indikator der erzielten Färbungsintensität des Präparates.

Nachdruck verboten.

Beobachtungen über die Entstehung von jungen Malaria- parasiten aus älteren.

Von **Moritz Silberstein**, Schiffsarzt, Amsterdam.

Seitdem Golgi für die Tertian- und Quartanparasiten, Marchiafava und Bignami für die kleinen Parasiten einen im wesentlichen gleichen Modus der Entwicklung der jungen Generationen aus älteren nachgewiesen haben, nämlich den durch Sporulation, ist derselbe allgemein von den Malariaforschern acceptiert worden. Spätere Untersucher, wie Mannaberg, namentlich aber Ziemann, haben die feineren Verhältnisse dieses Vorganges richtiggestellt. Auch kommt ihnen das Verdienst zu, gewisse andere Modalitäten der Sporulation, die von Golgi neben seiner ursprünglichen, gleichsam klassischen aufgestellt waren, als irrtümliche zurückgewiesen zu haben.

Danach besteht die Sporulation kurz darin, daß in dem herangewachsenen und einen soliden Klumpen von Protoplasma darstellenden Mutterparasiten sich das Pigment in der Mitte konzentriert, daß das Chromatin in eine bei den verschiedenen Arten der Parasiten verschiedene große Zahl von Teilstücken zerfällt, von denen jedes ein Stück der protoplasmatischen Substanz an sich zieht und mit dieser einen jungen Parasiten bildet. Die Anordnung, welche die jungen Gebilde vor ihrer Trennung wahrnehmen lassen, hat man bald als einer Margaretenblume, bald als einer Sonnenblume, bald als einer Morula gleichend unterschieden.

Während nun aber bei der Tertiana, namentlich aber der Quartana, Sporulationsformen im peripherischen Blute deutlich beobachtet werden können, sollen nach dem übereinstimmenden Zeugnis der Autoren die Sporulationsvorgänge bei kleinen Parasiten sich in den inneren Organen allein abspielen. Und in der Tat sind sie dort auch häufig genug gefunden worden. Es ziemt sich demnach, den eben beschriebenen Modus für die Bildung der jugendlichen Formen aus älteren als einen wissenschaftlich feststehenden zu betrachten und festzuhalten.

Indessen ist neuerdings die Allgemeingültigkeit dieses Prozesses von A. Plehn in einer Monographie (Die Malaria der afrikanischen

Negerbevölkerung, besonders mit Bezug auf die Immunitätsfrage) in Zweifel gezogen worden. Zwar weiß man, daß viele Parasiten es nicht bis zur Sporulation bringen, indem sie entweder früh zu Grunde gehen, oder von vornherein steril sind, was sich durch das Fehlen oder geringe Vorhandensein der Chromatinsubstanz kund gibt, oder endlich, indem sie sich in einer noch nicht hinreichend erkannten Weise zu Sphären und Halbmonden umwandeln und als Geschlechtszellen einem anderen Schicksal entgegengehen. Davon abgesehen aber, mußte nach den bisherigen Theorien jeder entwickelungsfähige Parasit denselben einheitlichen Weg wandeln, der zu seiner oben skizzierten Art der Sporulation führte.

Plehn nun läßt eine Sporulation nur bei den protoplasmareichen Tertian- und Quartanparasiten zu. Für die kleinen Parasiten der tropischen Fieber dagegen nur insofern, als sich einzelne Exemplare derselben morphologisch den großen Parasiten nähern, also auch reich an Protoplasma sind. Wo dieses nicht zutrefte, wo das Protoplasma an Masse gering sei, also bei den typischen Ringformen der kleinen Parasiten, da leugnet er das Vorkommen einer Sporulation. Diese sollen, nachdem sie eine gewisse Größe erreicht, einfach samt ihrem Blutkörperchen zerfallen. Höchstens soll unter Umständen ihr Kern erhalten bleiben und dann die Grundelemente für einen neuen Parasiten hergeben können. Es wäre also hiermit ein neuer Weg für die Bildung jugendlicher Formen aus älteren gefunden. Die Resorption der Zerfallsprodukte von Blutkörperchen und Parasit, und nicht die Sporulation, sei es, die den Fieberanfall auslöse. Gestützt wird diese Behauptung durch die Tatsache, daß Plehn auch trotz eifrigen Bemühens häufig genug bei der Untersuchung innerer Organe von Patienten, die an tropischer Malaria gestorben waren, keine Spur von Sporulationsformen gefunden hat. Daß die tropischen Ringe, wie die Erfahrung zeige, vor einem neuen Fieberanfall aus dem Blute schwinden, rühre nicht daher, daß sie sich zur Sporulation in innere Organe zurückziehen, sondern daß sie eben in großem Maßstabe zu Grunde gehen.

Ich habe die Arbeit Plehns zu einer Zeit gelesen, wo ich selbst mit Untersuchungen über das Schicksal der Malariaparasiten im menschlichen Blute beschäftigt war. Unter anderem suchte ich die Entstehung der jungen Parasitengeneration aus ihrem Mutterparasiten zu studieren. Hierzu veranlaßten mich einige eigentümliche Fälle von tropischer Malaria sowie Erfahrungen über Tertiana, die in mir die Ueberzeugung erweckten, daß junge Parasiten nicht immer dem Vorgange der Sporulation ihren Ursprung verdanken, und ferner, daß da, wo es zur Sporulation kommt, diese nicht immer nach dem althergebrachten Schema erfolgt, sondern durch das häufige Vorhandensein von wenig Protoplasma nicht unwesentlich modifiziert wird. In dem ersten Punkte allein berühren sich meine Konklusionen einigermaßen mit denen Plehns. In allen anderen Beziehungen aber differieren sie.

Um dies von vornherein deutlich zu machen, stelle ich sogleich voran, daß ich mehrere Wege der Entwicklung für eine ganze, umschriebene Gruppe protoplasmaarmer tropischer Ringformen zu jungen Formen zu beobachten Gelegenheit gehabt habe, während diese nach Plehn einem frühzeitigen Untergange geweiht sind. Ferner, wo es nicht zur Bildung einer Vielheit von Parasiten nach einem mit der typischen Sporulation identischen oder ihr verwandten Prozesse kommt, da kann aus einem Mutterparasiten ein einziger neuer Parasit entstehen,

aber nicht nur nach dem Modus von Plehn, wonach die Ringsubstanz gänzlich zu Grunde gehe und unter Umständen das Chromatin allein der Ausgangspunkt für einen neuen Parasiten werde — ein Modus, der mir trotz eigener Erfahrungen noch nicht sichergestellt genug erscheint — sondern vorwiegend in einer anderen, weiter unten zu beschreibenden Weise. Endlich soll gezeigt werden, daß dieselben Verhältnisse, welche die Entstehung der Jugendformen gewisser kleiner Parasiten beherrschen, auch bei großen Tertianparasiten zu finden sind, daß es also nicht erlaubt ist, in dieser Beziehung eine scharfe Grenze zwischen kleinen Parasiten und großen zu ziehen, daß es auch nicht angeht, die einen als arm an Protoplasma zu bezeichnen und die anderen als reich daran, da es auch große Tertianparasitenformen gibt, die ebenfalls relativ arm an Protoplasma sind. Wer hätte nicht auch bei *Tertiana simplex* feine Ringe im Jugendzustande und im herangewachsenen ganz phantastisch gestaltete, ein Maschenwerk feiner Fäden darstellende Formen gesehen, mit nur stellenweise stärkerer Anhäufung protoplasmatischer Substanz innerhalb dieses Maschenwerkes?

Den folgenden Ausführungen sind, soweit sie tropische Malaria betreffen, vor allem einige durch kleine Parasiten bedingte, bemerkenswerte Erkrankungen zu Grunde gelegt. In der Mehrzahl derselben konnte nicht mit Sicherheit ausgemacht werden, ob sie den halbmond- oder den sphärenbildenden kleinen Formen angehörten. Da ich indes die zu besprechenden Teilungsvorgänge wohl an zweifellos sphärenbildenden Parasiten beobachtet habe, dagegen an zweifellos halbmondbildenden bisher nicht, so ist es wohl gestattet, die übrigen Fälle, welche analoge Erscheinungen, wie die zweifellos sphärenbildenden kleinen Parasiten darboten, gleichfalls als solche zu betrachten.

Was die Fälle von *Tertiana simplex*, bedingt durch den großen Golgischen Parasiten, betrifft, so liegen den folgenden Untersuchungen meist solche von *Tertiana duplicata* zu Grunde, der beinahe ausschließlichen Form, unter der sich in meiner Umgebung diese Fieberform manifestiert.

Das Eigentümliche, sozusagen Exceptionelle, der zu Grunde gelegten Fälle lag nun darin, daß bei ihnen schon in der peripheren Zirkulation auch an kleinen Parasiten Erscheinungen auftraten, die als Teilungsvorgänge aufgefaßt werden mußten, was bei kleinen Formen nicht vorkommen soll.

Wir wollen nun im folgenden nacheinander erst die feinen, sodann die gröberen Ringformen betrachten.

1. Ringformen mit minimaler Protoplasma menge.

Diese finden sich bei tropischer Malaria außerordentlich häufig. Ihr Kontur ist wie mit der Feder gezeichnet, und in ihren Größenverhältnissen schwanken sie von den allerkleinsten Formen bis zu $\frac{1}{6}$ Blutkörperchengröße und darüber. Ihre Ringform ist sehr regelmäßig, ihr Chromatinkorn meist einfach. Manchmal indes, vor allem bei *Tertiana maligna*, sind die mittleren Formen auch blatt- und bandförmig. Was nun ihre Vermehrung betrifft, so kann man sich an geeigneten Fällen leicht überzeugen, daß sie nicht, kaum geboren, dem Untergange geweiht sind, sondern im Gegenteil eine oft außerordentliche, auf ihre Reproduktion gerichtete Lebenstätigkeit zeigen. Und zwar beginnt dieselbe entweder schon früh, indem gleichsam noch im Jugendalter der Parasiten

bereits Teilungsformen auftreten, oder solche treten erst später auf, nachdem der Ring eine gewisse Größe erreicht hat.

a) Frühzeitige Teilung.

Es beginnt zunächst eine Wucherung des Chromatins. Dieses wächst anfänglich in die Länge und wird stäbchen- oder vielmehr bogenförmig. Ein solcher Bogen umgreift oft die halbe Peripherie des Ringes, manchmal selbst mehr. Hin und wieder bleibt das Korn auch erhalten, und sitzt das verlängerte Stück Chromatin wie ein Kometenschweif an seinem Kern. In diesem Anfangsstadium der Teilung ist die Ringform noch stets erhalten. Bald darauf jedoch fängt auch der feine Protoplasmaring an, sich zu verändern, indem er sich streckt und noch dünner wird. Die Ringform bietet nun schnell alle Zeichen ihrer morphologischen Auflösung. Sie ist zerrissen und hängt an einem oder beiden Enden ihrem Chromatinkörper als ein feiner, oft wellig gestalteter oder unregelmäßig geknickter Faden an. In derselben Zeit hat das Chromatin seinen Wucherungsprozeß fortgesetzt. Jetzt beginnt seine Teilung. Das Stäbchen spaltet sich, die Bogenformen zerfallen in oft treppenartig übereinanderliegende Teilstücke, es treten noch Abschnürungen einzelner Körner auf etc. Der Endzustand ist eine Zerschneidung des gewucherten Chromatins in einzelne Abschnitte, während die Ringsubstanz, da sie sich an dem Wucherungsprozesse des Chromatins kaum aktiv beteiligt, neben der Chromatinmasse beinahe verschwindet.

Jetzt nehmen die einzelnen Chromatinstücke je eine gewisse Quantität des Protoplasmas der Ringsubstanz und bilden mit ihr einen neuen Parasiten. Dieser ist im Beginne oft nicht ringförmig, sondern den Verhältnissen seiner Entstehung entsprechend, im gefärbten Präparate vielfach kometenartig: ein kleines Korn mit einem bogig gekrümmten Protoplasmafaden. Die Anzahl der so entstandenen jungen Parasiten ist natürlich den Chromatinteilstücken entsprechend.

Daß die protoplasmatische Ringsubstanz bei dieser Form der Teilung eine so geringe Rolle spielt, liegt wohl hauptsächlich an der Schnelligkeit, womit sich der Prozeß der Teilung bei diesen jungen Formen abspielt. Demgemäß kommt es auch nicht zu einer Pigmententwicklung. Häufig ist der Anteil an protoplasmatischer Substanz, welcher einem der Teilstücke des Chromatins zugefallen ist, so außerordentlich klein, daß derselbe sich färberisch nicht nachweisen läßt. Wir haben dann scheinbar ein einfaches Chromatinkorn, aber mit einem Hof, einem Blutkörperchen aufliegend.

Von einer organischen Zerstörung der Ringformen, ihrem Untergange, ist also bei diesem Teilungsmodus keine Rede. Allein morphologisch verschwindet der Ring, indem er durch die andrängende, in Wucherung begriffene Chromatinmasse offenbar zersprengt und zerrissen wird. Er nimmt aber am Aufbau des neuen Parasiten seinen legitimen Anteil. Dies wird auch aus der Farbenreaktion seines Protoplasmas deutlich, das sich in allen Phasen mit der Romanowsky-Zieman'schen Methode schön blau färbt, während abgestorbenes Protoplasma dabei schwärzlich körnig erscheint.

Was nun die Ursache dieses Teilungsmodus, den ich einen frühzeitigen genannt und genauer noch einen überstürzten heißen möchte, so weiß ich dieselbe nicht. In einem meiner diesen Untersuchungen zu Grunde gelegten Fälle, der von Anfang an beobachtet werden konnte, nahm man in den ersten 24 Stunden den gewöhnlichen Entwicklungs-

vorgang der Parasiten wahr von kleinsten zu größeren, das Blutkörperchen $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ ausfüllenden Formen, welche letzteren im wesentlichen Ringformen oder Modifikationen derselben waren. Von da an bis kurz vor der Akme des Fiebers, welche nach weiteren 16 Stunden erreicht wurde, waren mehr kleine und mittlere Formen vorherrschend. Aber von der 40. Stunde an bis gegen den 24 Stunden später beginnenden Temperaturabfall waren ausschließlich die eben beschriebenen in überstürzter Teilung begriffenen feinen Formen vorhanden. Es kam also von einem gewissen Zeitpunkt an hier nicht mehr zur Ausbildung protoplasmareicher, älterer Gebilde.

Ebenso verhielt es sich wahrscheinlich bei einem Soldaten der N.-I. Armee, welcher erst in Behandlung kam, nachdem er schon mehrere Tage gefiebert hatte. Die bei ihm vorgenommenen Blutuntersuchungen umfaßten den letzten Fiebertag und boten ähnliche Befunde, wie im vorhergehenden Falle, d. h. nur kleine Teilungsformen.

In einem anderen Falle, der gleichfalls einen Soldaten betraf, und dessen Attacke nur 12 Stunden dauerte, waren während der ganzen Zeit bei den wiederholten Blutuntersuchungen nur kleinste und größere, in lebhaftester Chromatinteilung begriffene, sehr protoplasmaarme, wie mit der Feder gezeichnete Formen zu finden.

In einem vierten Falle endlich traf man typische Teilungsformen junger protoplasmaarmer Ringformen nur im Beginn des Fiebers und zwar mit derselben Intensität und Deutlichkeit, wie bei den vorhergehenden. Später dagegen grobe, kleine und mittlere sowie protoplasmareiche, große Parasiten in vergrößerten und getüpfelten Blutkörperchen. Demnach hat es sich hier um eine Tertiana simplex gehandelt, und geht daraus hervor, daß auch bei großen Parasiten sehr feine, protoplasmaarme Formen auftreten, und daß diese ein ähnliches Verhalten, wie gewisse Formen kleiner Parasiten zeigen können. Bemerkenswert ist ferner, daß hier zu Beginn lediglich protoplasmaarme, in lebhaftester Chromatinteilung begriffene Formen vorhanden waren, und daß erst aus diesen sich die protoplasmareichen und alle Charaktere der Golgischen Parasiten darbietenden Formen entwickelten, woraus gefolgert werden mag, daß die Protoplasmaarmut junger Parasiten durchaus nicht bedeutet, daß dies auch im weiteren Verlaufe so bleiben werde.

Es geht also aus obigen Beobachtungen so viel hervor, daß kleine Ringformen mit wenig Protoplasma keine so vergänglichen Gebilde sind, daß sie im Gegenteil unter Umständen, und zwar sowohl bei tropischen wie Golgischen Parasiten, eine große vitale Energie besitzen, und daß die Behauptung Plehns bezüglich derselben: „Teilungsvorgänge im Kern sind nicht zu beobachten“ l. c. p. 26 in ihrer Allgemeinheit nicht aufrecht zu erhalten ist. Allerdings trifft man ihren eben beschriebenen Teilungsmodus namentlich bei tropischen Formen nicht unter allen Umständen im peripheren Blute an. Das schließt aber nicht aus, daß er bei anderen Arten tropischer Parasiten vielleicht in inneren Organen stattfindet, wie der typische Sporulationsprozeß auch. Das könnte vielleicht für die kleinen, Halbmonde bildenden Parasiten der Fall sein, bei denen man ganz gewöhnlich Wucherungszuständen des Chromatins in der peripheren Zirkulation, aber keinen Teilungsvorgängen begegnet. Indes ist dies eine bloße Vermutung, auf die vorläufig weiter kein Wert gelegt werden soll. Tatsache ist jedenfalls, daß dieser Entwicklungstypus kleiner Ringformen, da bisher nicht beschrieben, nicht allzu häufig vorkommt, obwohl es verwunderlich ist, daß mir wenigstens vier derartige

Fälle in kurzer Zeit begegnet sind. Möglicherweise liegt das an der Malariaform. Meine Fälle stammen von Java, und soweit sie durch kleine Parasiten bedingt sind, gehören sie wahrscheinlich sämtlich einer ganz besonderen Gruppe an, nämlich, wie schon bemerkt und wie weiter unten noch ausführlich an der Hand einer genau verfolgten Krankengeschichte gezeigt werden soll, den kleinen sphärenbildenden an, einer Art, die noch in anderen Hinsicht gleichfalls Interesse verdient, weil sie wenigstens eine Stütze für die sogenannte, unter deutschen Autoren namentlich von Plehn betonte, Unitätstheorie der Malariaparasiten zu bieten scheint.

Wenn demnach die große Abteilung der halbmondbildenden Parasiten vorläufig außerhalb der bisherigen Erörterungen über Teilungsmodalitäten und Schicksalsgestaltungen junger protoplasmaarmer Ringformen zu fallen scheint, so ist damit nicht gesagt, daß sie es nun sind, welche vorwiegend in den Rahmen der von Plehn aufgestellten und in ihren wesentlichen Zügen schon angeführten Hypothese fallen. Auch hier ist Weiterentwicklung die Regel, Stillstand und Untergang die Ausnahme. Nur scheint — wie übrigens vielfach bei der anderen Gruppe auch — die Entwicklung feiner Ringformen sich im wesentlichen derart zu vollziehen, daß sie zu größeren Formen mit reichlichem Protoplasma auswachsen. Dies geht z. B. aus folgenden abgekürzt wiedergegebenen Fällen hervor:

Ein javanischer Kellner, Sakiman, erkrankt um 12 Uhr mittags mit Schüttelfrost. Im Blute zahlreiche kleinste Ringe von allerfeinster Zeichnung mit winzigem Chromatinkorn. Abends fieberfrei. Am folgenden Morgen starke Dosis Chinin, gleichzeitig Blutuntersuchung. Im Blute viele schönste Ringformen von ca. $\frac{1}{5}$ Blutkörpergröße mit reichlichem Protoplasma und stärkerem Korn. Keine einzige Form des vorhergehenden Tages. Um 3 Uhr neuer Anfall. Im Blute keine Parasiten. Am nächsten Tage gesund.

Es unterliegt hier wohl keinem Zweifel, daß die primären feinsten Ringe im weiteren Verlaufe zu den größeren und größeren ausgewachsen sind.

Zur selben Annahme muß man im folgenden Falle kommen:

Eine javan. Frau aus Deli erkrankt mit Frost, heftigen Kopfschmerzen und akuter Gastroenteritis, Temperatur 39,3. Im Blute nur aller kleinste, sehr feine Ringe von ca. $\frac{1}{16}$ Blutkörpergröße. Solitäre Chromatinkörner mit Hof. Kleinste, randständige Formen. Nachts fieberfrei, ebenso den ganzen folgenden Tag. In der fieberfreien Periode findet man im Blute nur protoplasmareiche, gröbere Ringe von $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{4}$ Blutkörpergröße. Da man bei der ersten Blutuntersuchung nur aller kleinste, feine, bei der zweiten nur größere, größere Formen fand, so können letztere nur aus ersteren hervorgegangen sein.

b) Spätere Teilung.

Haben sich die kleinen Parasiten mit minimaler Protoplasma menge nicht durch frühzeitige Teilung vermehrt, so können sie, falls sie durch kontinuierliche Weiterentwicklung ihrer konstitutiven Elemente nicht in größere Ringformen mit reichlichem Protoplasma übergegangen sind, ihren Charakter als feine Ringformen bewahren und zunächst weiterwachsen, wobei die achromatische Zone immer größer wird, während die basisch gefärbte periphere Zone dünn bleibt. Nun können sich in einem gegebenen Augenblicke die oben geschilderten Vorgänge wieder-

holen, d. h. unter vorwiegender Beteiligung des Chromatins an dem Zerschnürungsprozeß wird der Ring gesprengt, und die einzelnen Teilstücke treten mit je einem Chromatinstücke zu einem neuen Parasiten zusammen. Dies war vor allem in meinem dritten Falle gut zu sehen. Hier erreichten die großen Formen $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ Blutkörpergröße, blieben aber außerordentlich protoplasmaarm, während die Teilungsvorgänge am Chromatin durch ihre besondere Intensität auffielen.

In anderen Fällen jedoch vollziehen sich die Dinge, infolge einer weniger passiven Beteiligung des Protoplasmas, etwas komplizierter.

In dem ersten meiner Fälle, der später ausführlich mitgeteilt werden soll, sah man häufig von dem Chromatinkorn entgegengesetzten Pol des Ringes einen feinen Fortsatz ausgehen. Nicht selten waren es selbst mehrere Fortsätze, die von verschiedenen Punkten der Peripherie des Ringes ausstrahlten. Etwas später wurde die Ringform durch einen Protoplasmafaden, der quer von einer Peripherie zur anderen durch die achromatische Zone ging, in zwei meist ungleiche Hälften zerlegt, während zwischen den Fortsätzen sich quere Verbindungsfäden ausbildeten. War nur ein Fortsatz vorhanden, so spaltete er sich erst gabelförmig, sodann trat gleichfalls zwischen den divergierenden Fäden eine Verbindung auf. So kam es zu maschenförmigen Bildungen, von denen viele sehr fein gezeichnet blieben, andere jedoch etwas reichlicher mit Protoplasma versehen waren. Im weiteren Verlauf traten dann deutliche Zeichen der Chromatinbeteiligung auf, indem sich nicht selten größere maschenförmig konstruierte Parasiten mit 5—6 Chromatinkörnern zeigten, welche über ihre Oberfläche ausgestreut waren. Es ist wohl gestattet, diese letzteren aus dem vorhergehenden Zustande abzuleiten und hierin die Einleitung zur Teilung dieser Parasiten zu erblicken, deren weitere Phasen sich aber im peripheren Blute nicht mehr beobachten ließen. Doch ist so viel wohl mit einiger Sicherheit zu sagen, daß es hier nicht mehr zu einer klumpigen Gestaltung des Protoplasmas, wie beim typischen Sporulationsprozesse, kommen dürfte, da die Chromatinspaltung ja schon zugleich mit dem Beginne der Teilung auch die Endphase der Entwicklung des Protoplasmas des Mutterparasiten ankündigt. Eine Pigmententwicklung war neben der Chromatinteilung auch hier nicht zu konstatieren, da die protoplasmatische Substanz so gering war. Dagegen war eine solche bei analogen Bildungen etwas protoplasmareicherer kleiner sowie Golgischer Parasiten, wie wir gleich sehen werden, häufig sehr deutlich zu beobachten.

Es besteht endlich noch eine eigentümliche Art der Entwicklung junger Parasiten aus älteren protoplasmaarmen Ringformen, die jedoch bei den größeren Formen abgehandelt werden soll, da sie unter Umständen beiden gemeinsam ist.

(Fortsetzung folgt.)

Nachdruck verboten.

Ueber Niederschlagsbildung bei der Agglutination.

[Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie der k. k. Universität Innsbruck.]

Von Prof. Dr. **M. Löwit**, Innsbruck.

Mit 1 Tafel.

Die vorliegende Untersuchung wurde durch Beobachtungen über die bakterizide und agglutinierende Wirkung des Vogelplasma ohne Zusatz und das Vogelserum angeregt, die an einer anderen Stelle¹⁾ mitgeteilt sind. Dort hatte sich gezeigt, daß bei der Impfung des Plasma und Serum einer Ente und einer Gans mit verschiedenen Mikroben nach kurzem Aufenthalte im Thermostaten bei 37° C, manchmal aber auch bei Zimmertemperatur, ein fein- bis grobflockiger Niederschlag entstand, der makroskopisch völlig den Eindruck einer intensiven Agglutination machte. Bei der mikroskopischen Untersuchung im hängenden Tropfen überzeugte man sich jedoch sofort, daß die einzelnen Flocken nicht, wie bei der Agglutination im Säugetierblute, aus den zu Haufen vereinigten Mikroben bestehen, sondern daß die Hauptmasse der Flocken aus kugligen oder ovalen, schwach glänzenden plättchenartigen Gebilden gebildet wird, zwischen denen auch im nativen Präparat vereinzelt oder größere Mengen von Mikroben erkannt werden konnten. Hier stellte sich also die Agglutination zweifellos als eine Niederschlagsbildung mit eingeschlossenen Mikroben dar und bildete auf diese Weise einen interessanten Beleg für die von Paltauf und seinen Schülern²⁾ vertretene Theorie der Agglutination, welche ja in ihrer gegenwärtigen Fassung im wesentlichen dahin geht, daß die Mikroorganismen durch spezifische frei in der Flüssigkeit, aber auch an den Bakterienleibern selbst entstehende Niederschläge eingeschlossen und daher agglutiniert werden. Am Vogelblute war also in diesen Fällen die Darstellung und Sichtbarmachung des die Mikroben agglutinierenden Niederschlages in überraschend einfacher Weise gelungen, während ja bekanntlich die Unsichtbarkeit des die Mikroben verbindenden Niederschlages bei der Agglutination im Säugetierblute, abgesehen von den direkt erzeugten spezifischen Niederschlägen und einigen anderen von Kraus³⁾ bereits angeführten Fällen, der allseitigen Anerkennung der sonst so plausiblen Paltauf'schen Hypothese hindernd im Wege steht [Bordet⁴⁾, Dineur⁵⁾, Nicolle⁶⁾, Harrison⁷⁾].

Bezüglich dieses aus plättchenartigen Elementen zusammengesetzten Niederschlages in dem untersuchten Enten- und Gansplasma und Serum kann nur gesagt werden, daß derselbe in verdünntem Alkali, nicht aber

1) Vergl. Löwit, M. u. Schwarz, C., Ueber Bakterizidie und Agglutination im Normalblute. I. Bakterizidie und Agglutination im Normalserum und im künstlichen Plasma. (Zeitschr. f. Heilkunde. Abt. f. interne Med. 1903.)

2) Vergl. Kraus, R., Zur Theorie der Agglutination. (Zeitschr. f. Heilkunde. Bd. XXIII. 1902. Abt. f. interne Med. p. 369 f.)

3) a. a. O. p. 379 und Kraus, R. u. Seng, W., Wien. klin. Wochenschr. 1899. p. 1.)

4) Annal. de l'Institut Pasteur. T. XIII. 1899. p. 225.

5) Bulletin de l'académie royale de médecine de Belgique. T. XI. 1897. p. 705.

6) Annal. de l'Institut Pasteur. T. XII. 1898. p. 161.

7) Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXX. 1901. p. 115.

in verdünnter Säure und nicht bei erhöhter Temperatur (60° C) löslich war, daß dagegen aus dem ungeimpften Plasma und Serum durch verdünnte Essigsäure und auch noch durch manche andere Substanzen ein analoger Niederschlag ausgefällt werden konnte, der sich im wesentlichen wie der durch Bakterien gebildete Niederschlag verhielt. In dessen konnte man sich leicht davon überzeugen, daß der durch Säure ausgefällte Niederschlag aus dem Vogelplasma und Serum nicht mit der durch die Bakterien in Plättchenform niedergeschlagenen Substanz identisch war, oder zum mindesten nicht die gesamte Menge derselben enthielt, denn nach der Abzentrifugierung des durch Säure gebildeten Niederschlages zeigte das entsprechend neutralisierte Vogelplasma und Serum noch starke Fällung durch die betreffenden Mikroben.

Von besonderem Interesse erschien aber die Eigenschaft dieses eigenartigen Niederschlages aus dem Vogelplasma und Serum zu sein, daß eine entsprechende Färbung desselben bei mannigfacher Variation der Versuchsbedingungen nicht gelingen wollte. Weder im angetrockneten noch im feuchten Zustande, in der Flüssigkeit suspendiert und mehrfach zentrifugiert und gewaschen, war hier mit den verschiedensten Färbungen ein halbwegs brauchbares Resultat zu erzielen. Am besten wirkte noch wässrige konzentrierte Methylenblaulösung, welche dem abzentrifugierten und 2—3mal mit 1-proz. Kochsalzlösung gewaschenen Niederschlage in geringer Menge zugesetzt wurde, worauf nach 24-stündigem Stehen im Thermostaten bei 37° C eine leichte metachromatische Färbung (rosa bis rotviolett) der einzelnen plättchenartigen Elemente und eine dunkle Blaufärbung der vorhandenen Mikroben, im hängenden Tropfen untersucht, konstatiert werden konnte. Doch war die Färbung des Niederschlages immer nur sehr blaß; eine Antrocknung und Fixierung desselben am Deckglase erwies sich als unthunlich, weil dabei die charakteristische aus plättchenartigen Elementen bestehende Form des Niederschlages nicht erhalten blieb, derselbe vielmehr nur in Form einer blaßrosa bis blaßvioletten amorphen Wolke zwischen den Mikroben und um dieselben herum erkannt werden konnte.

Weitere chemische und morphologische Untersuchungen über den eben erwähnten bei dieser Art der Fällung im Vogelplasma und Serum beobachteten Niederschlag konnten aber nicht vorgenommen werden, weil bei der Verfolgung dieses Gegenstandes an zwei weiteren Gänsen dieser Niederschlag im Plasma ohne Zusatz und im Normalserum (gegen Typhus- und Coli-Bacillen, gegen *Vibr. cholerae* u. *Metschnikoff*, gegen den *B. pyocyaneus*) unter den gleichen Versuchsbedingungen nicht entstand, unter welchen derselbe an der ersten Ente und Gans bei wiederholten Versuchen mit großer Leichtigkeit und Prägnanz zu stande gekommen war.

Es hatte sich also bei diesen beiden Tieren um eine zufällige, vielleicht durch individuelle Verhältnisse bedingte Niederschlagsbildung in dem geimpften Plasma und Serum gehandelt, welche höchst wahrscheinlich durch Fällung eines im Plasma und Serum der beiden genannten Tiere enthaltenen Körpers bedingt worden war, welche aber nicht einmal eine Verallgemeinerung für das Vogelblut überhaupt, geschweige denn für das Säugetierblut gestattete. Immerhin war durch diese Beobachtungen der Wunsch angeregt worden, die Frage der Niederschlagsbildung bei der Agglutination einer erneuerten Prüfung zu unterziehen.

Gewiß ist jedem Beobachter, der sich mit der mikroskopischen Untersuchung agglutiniertes Mikroben im hängenden Tropfen eingehend be-

schäftigt hat, die Erfahrung bekannt, daß die in einem Haufen agglutinierten Organismen zwar in der Regel dicht aneinander gedrängt sind und einen Zwischenraum zwischeneinander nicht frei lassen, aber gar nicht so selten kommen sowohl im Normalserum als auch im Immunsorum solche Haufen vor, bei welchen die agglutinierten Mikroben nicht dicht nebeneinander liegen, sondern durch größere oder kleinere helle und scheinbar leere Zwischenräume voneinander getrennt sind, welche gewissermaßen eine Verbindung zwischen den einzelnen Mikroben im Haufen herzustellen scheinen. Gerade solche Haufen legen doch den Gedanken ungemein nahe, daß hier zwischen den im Haufen befindlichen Mikroorganismen eine homogene, amorphe Substanz als Verbindung oder als Niederschlag vorhanden sein müsse, welche sich wahrscheinlich wegen ihrer besonderen Lichtbrechungsverhältnisse von der umspülenden Flüssigkeit oder von dem umgebenden Medium überhaupt nicht abhebt, und daher als solche nicht erkannt werden kann.

Aber alle Versuche, diese supponierte, die Mikroben im agglutinierten Haufen untereinander verbindende, sie gewissermaßen einschließende Substanz im hängenden Tropfen oder am angetrockneten Deckglaspräparate¹⁾ zur Darstellung zu bringen, schlugen mir anfangs vollständig fehl, wie sie ja auch vor mir bereits von zahlreichen anderen Beobachtern nicht zur Darstellung gebracht werden konnte. Immerhin hatten diese Bemühungen am Hunde- und Kaninchenserum den Erfolg, daß man bei Vornahme der Färbung mit konzentrierter wässriger Methylenblaulösung in der oben am Gänseplasma und Serum angeführten Weise äußerst blasse metachromatische Färbungen einer zwischen den agglutinierten Mikroben befindlichen homogenen Substanz erzielen konnte, welche aber entscheidende Bilder für die hier verfolgte Frage nicht lieferten.

Erst der mehr gelegentlich gemachte Befund, daß man mit verdünnter wässriger Eosinlösung und mit rotstichigem wässrigem Methylenblau, namentlich mit der nach Nocht²⁾ hergestellten stark rotstichigen Methylenblaulösung gute Färbungen der supponierten Zwischensubstanz zwischen den agglutinierten Mikroben erhält, führte zur Ausarbeitung einer Methode, mit welcher die färberische Darstellung dieser Zwischensubstanz gut gelungen ist. Diese Methode besteht in folgendem:

In dem Normalserum oder Immunsorum verschiedener Tiere — es wurde an Kaninchen, Hunden, Meerschweinchen und Affen (*Hamadryas macacus*)³⁾ gearbeitet — wurde im unverdünnten oder in entsprechend verdünntem Zustande des Serum Agglutination verschiedener Mikroben hervorgerufen; Typhusbacillen und *Vibrio cholerae* kamen dabei vorwiegend in Verwendung, doch wurden auch andere bewegliche Mikroorganismen (*B. coli*, *B. pyocyaneus*, *V. Metschnikoff*) gelegentlich geprüft. Sobald die im Thermostaten bei 37° C vor sich gehende Agglutination makroskopisch gut kenntlich war, oder auch früher, wenn

1) Will man mikroskopische Präparate agglutinierten Bakterien herstellen, so wird man, da die agglutinierten Mikroben namentlich bei Verwendung des Kaninchenserum in der Wärme desagglutiniert werden (im Meerschweinchen Serum ist das nicht der Fall), beim Antrocknen der agglutinierten Haufen an das Deckglas die Wärmewirkung ganz vermeiden müssen, oder sie doch jedenfalls den Wert von 40–50° C nicht übersteigen lassen dürfen.

2) Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. Bd. XXV. 1899. p. 764.

3) Prof. Bernheimer hatte die große Liebenswürdigkeit, die Benutzung des Blutes zweier von ihm im Institute am Großhirn operierter, sonst aber ganz gesunder Affen für den vorliegenden Zweck zu gestatten, wofür ihm auch an dieser Stelle mein besonderer Dank ausgesprochen sei.

es sich darum handelte, die der fertigen Agglutination vorausgehenden Veränderungen im Serum und an den Mikroben festzustellen, wurden im Spitzröhrchen 10—15 ccm sterilen destillierten Wassers zugesetzt und durch eine kräftige Zentrifugierung die agglutinierten Mikroben abgetrennt, was meistens nach 10—20 Minuten erfolgt war. Hierauf wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen und die Zentrifugierung mit der gleichen Flüssigkeitsmenge noch 2mal wiederholt, um sämtliche Beimengungen des Serums zu entfernen. Die nach jeder Zentrifugierung von neuem aufgeführten Mikroben können dann, in wenig Flüssigkeit suspendiert, entweder sofort oder nach einiger Zeit zu den folgenden Färbungen verwendet werden.

Es sei gleich an dieser Stelle betont, daß mit sämtlichen verwendeten Mikroben Kontrollversuche in der Weise angestellt wurden, daß von einer frischen, höchstens 18—20 Stunden alten Agarkultur des betreffenden Stammes eine entsprechend kleine Menge abgestrichen, in 0,75-proz. Kochsalzlösung fein verteilt und nach einem Aufenthalte von 10—15 Minuten im Thermostaten bei 37° C sofort der 3maligen Zentrifugierung mit destilliertem Wasser unterzogen wurde. Mit den auf diese Weise abgesetzten Mikroben wurden (zur Kontrolle) jeweilig die gleichen Färbungen wie mit den agglutinierten in folgender Weise vorgenommen.

Eine Oese der 3mal zentrifugierten, gewaschenen und in wenig destilliertem Wasser aufgeschwemmten Mikroben wird auf das Deckglas übertragen, hier etwas ausgebreitet und dann an der Luft oder unter zeitweiligem schwachem Erwärmen am Deckglase angetrocknet. Hierauf werden auf die beschickte Seite des Deckglases 1—2 Tropfen der Nochtschen Methylenblaulösung gebracht, das Deckglas wird dann bis zur Rauchentwicklung an der Flamme erhitzt und dann erkalten gelassen. Nach wenigen Minuten wird die überschüssige Farbe vom Deckglase vollständig abgespült und das Präparat neuerdings in analoger Weise wie oben getrocknet. Untersucht man die Präparate von agglutinierten Mikroben nach Einschluß in Balsam in diesem Zustande mit starken Systemen, so wird man jetzt bereits, da wo Agglutination zu stande gekommen war, in der Regel neben den gut gefärbten, gut erhaltenen oder in gewissem Sinne veränderten Mikroben, eine mehr oder weniger deutliche blaßbläuliche bis blaßrotviolette Zwischensubstanz in und an den agglutinierten Haufen erkennen können, in welcher die Mikroben eingebettet erscheinen, und welche in den in analoger Weise hergestellten, aber in Löfflers Methylenblau gefärbten Präparaten entweder gar nicht oder nur andeutungsweise kenntlich ist. Es liegt also eine Zwischensubstanz vor, welche in der basischen Farbe allein nicht oder nur sehr unvollkommen färbbar ist, welche dagegen bereits dem Rot aus Methylenblau [Methylen-Azur¹⁾] gegenüber in der Nocht-Blau Farbenlösung eine weit bessere Färbbarkeit aufweist. Namentlich ist dies bei agglutinierten Choleravibrionen der Fall, bei welchen die mit Nocht-Blau allein gefärbten Präparate die Zwischensubstanz in weit besserem Grade als bei agglutinierten Typhusbacillen erkennen lassen.

Untersucht man nun Kontrollpräparate normaler (nicht agglutiniertes) Mikroben, welche direkt vom Agar abgestrichen, in der oben angegebenen Weise hergestellt und dann der gleichen Färbungsbehandlung unter-

1) Vergl. Michaelis, L., Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXIX. 1901. p. 763, sowie L. Michaelis und Wolff, A., Virchows Archiv etc. Bd. CLXVII. 1902. p. 151 f.

worfen wurden, so sind weder makro- noch mikroskopisch Zeichen der Agglutination nachweisbar und von der angeführten Zwischensubstanz ist nichts zu sehen. Veränderungen des Mikrobenleibes sind aber an diesen Kontrollpräparaten, wenn auch nur sehr spärlich, jedenfalls vorhanden; einzelne Mikroben erweisen sich nur als schwach färbbar, andere zeigen abnorme, geblähte Formen, auch sind an einzelnen Mikroben die Zeichen der Plasmolyse und Plasmoptyse [A. Fischer¹⁾] zweifellos kenntlich, aber diese Veränderungen sind doch nur recht selten konstaterbar, die bei weitem größte Zahl der vorhandenen Mikroben bietet in diesen Kontrollpräparaten bezüglich Färbbarkeit und Aussehen völlig normale Verhältnisse dar. Diese Beobachtung steht in Uebereinstimmung mit der Angabe von A. Fischer²⁾, daß beim Uebertragen plasmolysierbarer Bakterien (außer Cholera) vom Agar in Kochsalzlösung von 0,75 oder 2 Proz. die Plasmoptyse nicht sofort eintritt, daß vielmehr zu mindesten ein Aufenthalt von $\frac{1}{2}$ Stunde in der Salzlösung nötig ist, um bei der darauffolgenden Uebertragung in Wasser die sofortigen Erscheinungen der Plasmolyse und Plasmoptyse zu erhalten, während in den obigen Versuchen die Mikroben höchstens 10—15 Minuten in der Kochsalzlösung verblieben und dann sofort wieder in Wasser zentrifugiert wurden. Jedenfalls kann gesagt werden, daß die durch Färbung darstellbaren Erscheinungen der Plasmolyse und Plasmoptyse an den der gleichen Behandlung unterzogenen Kontrollpräparaten normaler (nicht agglutinerter) Mikroben, namentlich bei *Bac. typhi*, *B. coli commune*, nur sehr geringgradige sind³⁾, daß hier, soweit das mit den verwendeten Methoden überhaupt erkennbar ist, so gut wie normale Verhältnisse bezüglich Aussehen und Färbbarkeit der Mikroben herrschen, und daß an ihnen niemals die im folgenden zu beschreibenden Erscheinungen der Niederschlagsbildung zur Beobachtung kamen, welche mit den gleichen Methoden an den der Agglutination unterworfenen Mikroben erkannt werden konnten. Damit ist wohl zur Genüge dargetan, daß diese letzteren nicht durch die angewendeten Untersuchungsmethoden für sich allein bedingt sein können.

Wenn nun auch die angegebene Färbung der agglutinierten Mikroben mit N o c h t b l a u bereits die zwischen den Mikroben befindliche Zwischensubstanz ziemlich deutlich erkennen läßt, so erschien es doch wünschenswert, diese Substanz in morphologischer Beziehung noch schärfer und klarer hervortreten zu lassen. Dieses Ziel wurde durch Nachfärbung mit Eosin erreicht, das auch in starken Verdünnungen eine große färberische Affinität zu jener Zwischensubstanz besitzt. Da aber auch stark verdünnte wässrige Eosinlösungen die mit Methylenblau oder N o c h t b l a u vorgefärbten Präparate sehr rasch entfärben und auf diese Weise eine gleichzeitige Darstellung der durch Methylenblau gefärbten Mikroben und der durch Eosin gefärbten Zwischensubstanz nur unter besonders günstigen, dabei aber immerhin vom Zufall abhängigen Bedingungen gestatten, so stieß die angestrebte Doppelfärbung anfangs auf große

1) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionsk. Bd. XXXV. 1900. p. 1.

2) a. a. O. p. 25 ff.

3) Bei nicht agglutinierten (normalen) in analoger Weise behandelten Cholera-vibrionen sind die angeführten Veränderungen, wahrscheinlich infolge größerer Empfindlichkeit dieser Mikroben gegen osmotische Einwirkungen (A. Fischer), etwas stärker ausgebildet, aber auch hier findet sich normales Aussehen und normale Färbbarkeit bei der Ueberzahl der vorhandenen Mikroben. *B. pyocyaneus* hingegen wurde durch die angewandte Methode weit stärker verändert und erwies sich mithin zu den vorliegenden Untersuchungen nicht recht brauchbar.

Schwierigkeiten, die erst überwunden wurden, als es gelang, eine passende Mischung von Nochtblau-Eosin für die Nachfärbung mit Eosin darzustellen.

Diese Mischung besteht aus 2 ccm der von mir verwendeten stark alkalischen und rotstichigen Nochtblaulösung, der 3 Tropfen einer konzentrierten (gesättigten) wässerigen Lösung von wasserlöslichem Eosin (Grübler) beigesetzt werden. Die Mischung nimmt einen blauvioletten Farbenton an und enthält keinen Niederschlag, während beispielsweise eine Mischung von 2 ccm der gleichen Nochtblaulösung und 2 Tropfen der wässerigen Eosinlösung einen starken Niederschlag enthält. Im Dunkeln aufbewahrt, bleibt die erstere Mischung lange in ihrem anfänglichen Zustande erhalten, am Lichte bildet sich nach 1—3 Wochen ein deutlicher Niederschlag, worauf dann die Mischung an Färbekraft verliert. Es ist sehr wahrscheinlich, daß der jeweilige Alkaligehalt und die jeweilige Beschaffenheit der verwendeten Nochtblaulösung auf das Zustandekommen einer niederschlagsfreien Mischung von Einfluß ist, weshalb wohl verschiedene Nochtblaulösungen eines differenten Zusatzes der Eosinlösung bedürfen werden. Wahrscheinlich ist in dieser Mischung das sogenannte eosinsaure Methylenazur (Michaelis und Wolff) bei der Färbung beteiligt, doch können hierüber bestimmte Angaben nicht gemacht werden.

Diese Mischung wird nun in der Weise verwendet, daß ein oder zwei Tropfen derselben auf das mit Nochtblau vorgefärbte und wieder völlig trockene Präparat gebracht und möglichst rasch wieder abgespült werden, worauf nach neuerlicher Trocknung des Präparates der Einschluß in Balsam erfolgt. Die Dauer der Einwirkung der Nochtblau-Eosinmischung darf nur eine sehr kurze, wenige Sekunden betragende sein, da auch diese Mischung noch ein sehr starkes Entfärbungsvermögen gegen die mit Methylenblau und Nochtblau gefärbten Präparate besitzt. Hier hängt alles von der Färbungsdauer der Nochtblau-Eosinmischung ab, einige Sekunden zu viel oder zu wenig können dabei für den erzielten Färbungscharakter des Präparates von Bedeutung sein. Es ist Sache der Uebung, hier das richtige Zeitmaß zu finden, das in meinen Beobachtungen etwa zwischen 2—10 Sekunden lag, wobei zu berücksichtigen ist, daß sich auch die verschiedenen Mikrobenarten in verschiedenem Grade resistent gegen die Entfärbung bei der nachträglichen Behandlung mit der Nochtblau-Eosinmischung zeigten, und daß auch die Zwischensubstanz in den agglutinierten Haufen bei Verwendung verschiedener Mikrobenarten ein verschiedenes Färbungsvermögen der genannten Mischung gegenüber besitzt. So hat es sich beispielsweise gezeigt, daß die Zwischensubstanz in den agglutinierten Haufen der Choleravibrionen, die sich mit Nochtblau bereits gut zur Darstellung bringen läßt, die nachträgliche Eosinfärbung weit schwerer annimmt, als jene der Typhus- und Coli-Bacillen, sowie des V. Metschnikoff. In jedem Falle aber wird man wohl mit dem Umstande zu rechnen haben, daß auch in gut gelungenen Doppelfärbungen von Mikroben- und Zwischensubstanz in den agglutinierten Haufen ein Teil der Mikroben bereits entfärbt sein dürfte; je kleiner und dünner der Haufen ist, desto größer ist namentlich an den Randpartieen desselben die Gefahr der Mikrobenentfärbung daselbst.

Ob nun die bei den Doppelfärbungen erzielte Tinktion der Zwischensubstanz in den agglutinierten Haufen eine reine Eosinfärbung oder eine

Färbung mit einer besonderen in dem Gemenge erst entstandenen Mischfarbe (eosinsaures Methylenazur nach Michaelis und Wolff) darstellt, wurde nicht weiter geprüft; es kann in dieser Beziehung nur gesagt werden, daß man, wie bereits erwähnt wurde, auch mit reiner wässriger, stark verdünnter Eosinlösung eine deutliche Eosinfärbung der Zwischensubstanz bei vorausgegangener Methylenblaufärbung der Mikroben in den agglutinierten Haufen erzielen kann.

Die mit der eben beschriebenen Methode angestellten Untersuchungen erstrecken sich auf die Agglutination des Typhus und Coli-Bacillus, des *B. pyocyaneus*, des *Vibrio cholerae* und *V. Metschnikoff* bei Einwirkung des Normalserums von Rind, Kaninchen, Katze, Meerschweinchen, Hunden, Affen, Enten und Gänsen, ferner des Typhus- und Choleraimmunserums von Kaninchen und Meerschweinchen, sowie der zugehörigen Kontrolluntersuchungen an den nicht agglutinierten, sonst aber in gleicher Weise behandelten Mikroben. Es wurde ferner auch die Agglutination der durch Wärme (bis zu 60° C) abgetöteten Typhusbacillen durch die verschiedenen Sera, sowie die sogenannte chemische Agglutination (Malvoz)¹⁾ des Typhusbacillus durch Säurewirkung in das Bereich der Untersuchung gezogen. Am eingehendsten wurde die Wirkung der Normalsera vom Kaninchen, Meerschweinchen, Rind und Affen gegen die genannten Mikroben geprüft.

In dieser Beziehung kann nun gesagt werden, daß auch im Normalserum vom Kaninchen, Meerschweinchen, Rind und der Katze die Agglutination der genannten Mikroben bei geringer Verdünnung des Serums (1:0—1:10) in der Regel nicht vermißt wird und nach wechselndem Aufenthalte bei 37° C (von 10 Minuten bis zu 24 Stunden) makro- und mikroskopisch, manchmal namentlich bei schwacher Agglutination aber nur mikroskopisch konstatiert werden kann. In der Literatur findet sich vielfach die Angabe, daß die Normalsera von Kaninchen und Meerschweinchen gegen Typhus, Cholera und andere Mikroben nicht agglutinierend wirken; dieses negative Resultat dürfte nach meinen Erfahrungen vor allem durch den gewählten Verdünnungsgrad und auch durch den verwendeten Mikrobenstamm veranlaßt sein. Auch ich habe Typhus- und Coli-Stämme in der Hand gehabt, welche auch bei schwacher Verdünnung des Normalserums inagglutinabel waren, während andere Stämme im gleichen Serum und bei gleicher Verdünnung sehr schöne Agglutination darboten. Im allgemeinen wurde durch derartige Verhältnisse die Regel nicht beeinträchtigt, daß auch das Normalserum die Erscheinung der Agglutination darbietet, die sich nicht wesentlich von der gleichen Erscheinung im Immunserum unterscheidet.

Dagegen konnten wohl in dem Verhalten der agglutinierten Mikrobenhaufen bei Verwendung der Normalsera verschiedener Tierarten gewisse chemische Differenzen gefunden werden, die zwar nicht allseitig durchgeprüft und mit den Verhältnissen im Immunserum verglichen worden sind, welche aber doch auf gewisse, wenn auch nicht prinzipielle chemische Differenzen des unter dem Einflusse verschiedener Tiersera zustande gekommenen Agglutinationsvorganges hinweisen. So erscheinen

1) *Annales de l'Institut Pasteur* T. XI. 1897. p. 582. *Ibid.* T. XII. 1898. p. 857 et T. XIII. 1899. p. 630.

die im normalen Kaninchenserum agglutinierten Typhusbacillen (Typhus S) nach kurzer Einwirkung (2—5 Minuten) einer Temperatur von 55—60° C wieder desagglutiniert, ja vielfach erwiesen sich unter diesen Verhältnissen die wieder frei gewordenen Typhusbacillen völlig normal beweglich, was auch von anderer Seite bereits beobachtet wurde. Die im Normalserum von Meerschweinchen agglutinierten Typhusbacillen (Typhus S) werden aber auch nach einer 10 Minuten langen Einwirkung von 55—60° C nicht mehr desagglutiniert; das Gleiche gilt bezüglich der Agglutination von Coli-Bacillen (Coli III) und Choleravibrionen (Cholera M) im Meerschweinchen Serum. Hier scheint also die Bindung zwischen Agglutinin und agglutinabler Substanz eine festere, und die Desagglutination der agglutinierten Mikroben eine schwerere als im Kaninchenserum zu sein.

Außerdem liegen auch gewisse Differenzen bezüglich der Desagglutination der agglutinierten Haufen in verdünnten Säuren und Alkalien vor, je nach Verwendung verschiedener normaler Tiersera. So genügt eine geringe Menge verdünnter Säure (Essigsäure, Salzsäure), um die im Kaninchenserum agglutinierten Haufen der verschiedenen Mikroben wieder zu desagglutinieren, während verdünnte Lauge (1-proz. NaOH) hier manchmal versagt, manchmal aber erst bei stärkerem Zusatz die Desagglutination hervorruft. Im Meerschweinchen Serum hingegen versagt vielfach die verdünnte Säure, während das verdünnte Alkali meist leicht und sicher die Desagglutination bewirkt; im Katzenserum wiederum erweisen sich verdünnte Säure und verdünntes Alkali nahezu gleich wirksam und bedingen beide in gleichem Grade Desagglutination. Ob hier wirklich differente Lösungsverhältnisse der agglutinierten Substanz vorliegen, oder ob hierbei nur der verschiedene Salzgehalt der verwendeten Tiersera, eventuell sonstige Differenzen derselben, an der verschiedenen Desagglutinierbarkeit beteiligt sind, wurde nicht näher geprüft. Jedenfalls weisen derartige Beobachtungen darauf hin, daß die Agglutination der Mikroben nicht ausschließlich durch die Mikroben selbst beeinflusst wird, sondern daß noch andere durch das umgebende Medium bedingte Umstände auf dieselbe einwirken. Eisenberg und Volk¹⁾, Eisenberg²⁾, Pick³⁾ haben gleichfalls Angaben über die Einwirkung von Wärme, von Säuren und Alkali etc. auf die Agglutination und die dabei mitwirkenden Komponenten vorwiegend im Immunserum gemacht und führen die gefundenen Veränderungen hauptsächlich auf Alteration des Agglutinins und der agglutinierbaren Substanz, weniger auf solche der agglutinierten Substanz zurück.

Das morphologische Verhalten der agglutinierten Mikrobenhaufen, soweit dasselbe mit der früher beschriebenen Methode erkannt werden kann, wurde der Hauptsache nach im Normal- und Immunserum als gleichartig befunden; es läßt sich kurz dahin charakterisieren, daß zwischen den agglutinierten Mikroben stets eine homogene, die Mikroben untereinander verbindende und in wechselnder Menge vorhandene Zwischensubstanz sicher nachgewiesen werden kann, welche eine deutliche färbereiche Affinität zu Eosin und vielleicht auch zu gewissen

1) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionsk. Bd. XL. 1902. p. 155 f.

2) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. p. 773 f.

3) Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. I. 1901. p. 351 ff.

Mischfarben (eosinsaures Methylenazur) besitzt. Die agglutinierten Mikroben sind mithin in einem Niederschlage eingeschlossen und es erscheint damit auch der morphologische Nachweis für die Annahme, daß (in den untersuchten Fällen) die Agglutination der Bakterien dem Wesen nach als eine Niederschlagsbildung aufzufassen ist, erbracht. (Vergl. Tafel, Fig. 1, 2, 3, 4, 5.)

Bezüglich dieses Niederschlages oder dieser Zwischensubstanz ist nun zu sagen, daß sie im gefärbten Präparate — im ungefärbten ist sie in diesem Maße überhaupt nicht sichtbar — den Eindruck einer mehr oder weniger völlig homogenen Masse macht, an welcher aber ab und zu auch eine gewisse Gitterung hervortreten kann; jedenfalls ist die Substanz meistens völlig strukturlos und macht auch in dieser Beziehung den Eindruck eines amorphen Niederschlages. Dieser Niederschlag findet sich in der Regel stets mit eingeschlossenen Bakterien vergesellschaftet, ab und zu, wenn auch sehr selten, können bakterienfreie, rosa gefärbte Niederschläge im Präparate gefunden werden, doch muß gleich an dieser Stelle betont werden, daß derartige Befunde nicht als Beweis für die freie Entstehung der Niederschläge, das ist für ihre unabhängig von den Bakterien erfolgende Bildung angesprochen werden können, da dem früher Erwähnten entsprechend, nur eine scheinbare Abwesenheit der Bakterien, durch Entfärbung derselben, vorliegen kann.

Die Form des Niederschlages schließt sich in der Regel eng an die durch die gefärbten Mikroben begrenzte und durch dieselben deutlich kenntliche Haufenbildung an, dabei sind die Mikroben in diesen Haufen bald dichter, bald dünner gesät, gelegentlich können auch mitten im Haufen oder am Rande bakterienfreie Stellen des Niederschlages vorhanden sein (Fig. 1, 2, 3, 4a, 6), die aber, wie der Bakteriengehalt der Haufen im Präparate überhaupt, durch die bei der geschilderten Färbung wohl unvermeidliche Entfärbung der Mikroben mitbedingt sein können. Die innige Beziehung des roten oder bläulichen Niederschlages zu den Mikroben in den Präparaten schützt wohl vor dem Einwande, daß man es dabei nur mit einem aus der verwendeten Mischfarbe (Nochtblau-Eosin) stammenden Niederschlage zu tun hat, eine Annahme übrigens, welche gegenüber den Resultaten an den Kontrollpräparaten, an welchen der gefärbte Niederschlag völlig fehlt, und gegenüber den sofort zu erwähnenden Befunden an den isolierten, außerhalb der agglutinierten Haufen liegenden Mikroben nicht aufrecht erhalten werden könnte.

Es fragt sich nun, ob wir durch die geschilderte Färbungsmethode einen Aufschluß über die Entstehung des die Bacillen agglutinierenden Niederschlages erhalten können. Bekanntlich vertrat Paltauf¹⁾ auf Grund der von Kraus²⁾ entdeckten spezifischen Niederschlagsbildungen die Anschauung, daß die Agglutination durch frei im Serum wahrscheinlich durch Gerinnungsvorgänge zu stande kommende spezifische Niederschläge entsteht, welche die vorhandenen Mikroben gewissermaßen abfangen und einschließen, wobei also den Mikroben eine mehr passive Rolle zufällt. Später hat Paltauf³⁾ seine Anschauung dahin modifi-

1) Wien. klin. Wochenschr. 1897. p. 431.

2) Ebenda. 1897. No. 32. p. 736.

3) Vergl. bei Kraus, R., Zeitschr. f. Heilk. Bd. XXIII. 1902. p. 379.

ziert, daß er die Agglutination nicht bloß auf freie, unabhängig von den Mikroben entstehende, spezifische Niederschläge zurückführt, sondern daß er die Bildung der Niederschläge in die Bakterien selbst verlegt, und neben den frei entstehenden auch die an den Bakterien selbst entstehenden Niederschläge als Ursache der Agglutination anspricht. Zahlreiche andere Autoren hatten dann gleichfalls auf die Abstammung der agglutinablen Substanz aus den Mikroben (oder aus den agglutinierten zelligen Elementen, Elfstrandt¹⁾ und auf den Umstand hingewiesen, daß die Mikroben bei der Agglutination keine rein passive Rolle spielen (Bordet²⁾); doch soll auf die näheren Literaturangaben hier mit Rücksicht auf die zahlreichen vorhandenen Literaturzusammenstellungen nicht eingegangen werden. Es sei hier nur darauf hingewiesen, daß Fr. Müller³⁾ das Austreten von Inhaltsmasse bei der Agglutination von Kaninchenerythrocysten unter dem Einflusse von Rizin direkt beobachten konnte, und daß E. P. Pick⁴⁾ die aus den Bakterien stammende (Bakterienkoagulin) und die aus dem Serum stammende Komponente (Serumkoagulin) gesondert prüfen und das Bakterienkoagulin als das chemisch aktive wesentliche Agens, das Serumkoagulin hingegen als den passiven Komplex der ganzen Erscheinung ansprechen konnte⁵⁾. Ebenso räumt die Annahme von Nolf⁶⁾, daß bei der Agglutination die äußere Schicht der Mikroorganismen in einen kolloiden, erstarrungsähnlichen Zustand (gélification) übergeführt wird, sowie jene von Gruber⁷⁾, daß durch die Immunsere gewisse Stoffe in den Bakterienmembranen unlöslicher gemacht, verschrumpft und zur Ausscheidung gebracht werden, wodurch auf der Oberfläche der Bakterien klebrige Rauigkeiten entstehen, den Mikroorganismen eine aktive Rolle beim Zustandekommen der Agglutination ein, ohne dieselbe jedoch schärfer zu präzisieren.

Die im folgenden mitzuteilenden Beobachtungen stehen mit der Anschauung in guter Uebereinstimmung, daß den Bakterienleibern selbst eine nicht unwesentliche Rolle bei der Bildung des durch die angeführte Färbungsmethode darstellbaren Niederschlages zufällt, und erbringen morphologische Anhaltspunkte über die Art der Niederschlagsbildung an den Mikroorganismen.

Untersucht man nämlich die größeren, nach der angegebenen Methode in den Präparaten gefärbten Haufen (Fig. 1, 2, 3, 5), so wird man an diesen keinen Anhaltspunkt über die Beziehung der Mikroben zu der gefärbten Zwischensubstanz gewinnen können. Die Mikroben bieten zwar hier häufig Veränderungen ihrer Beschaffenheit dar, auf die wir noch zurückkommen, allein diese Veränderungen gewähren zunächst keinen Einblick in die Entstehung der gefärbten Zwischensubstanz. Das Gleiche gilt auch für die kleineren Haufen, kurz für alle Mikrobenballen, in denen die Agglutination abgelaufen und fertig vorliegt.

Ueber die Beziehung der Mikroben zu dem bei der Agglutination nachgewiesenen Niederschlage gewährten dagegen in manchen nach Ab-

1) Görbersdorfer Veröffentlichungen, herausgegeben von R. Kobert, Bd. I. Stuttgart 1898. p. 48.

2) Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XIII. 1899. p. 225 s.

3) Arch. f. exper. Path. etc. Bd. XLII. 1899. p. 302.

4) Hofmeisters Beiträge z. chem. Phys. u. Path. Bd. I. 1901. p. 351 f.

5) a. a. O. p. 464.

6) Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XIV. 1900. p. 297 s.

7) Vergl. bei Kraus, R., l. c. p. 373.

lauf der Agglutination hergestellten Präparaten die isolierten, nicht in den agglutinierten Haufen eingeschlossenen Mikroben bereits einen gewissen Aufschluß, noch besser aber konnte man sich über die hier in Betracht kommenden Verhältnisse orientieren, wenn man den Vorgang der Agglutination im Reagenzröhrchen nicht vollständig ablaufen ließ, dieselbe vielmehr zu verschiedenen Zeiten ihres Ablaufes unterbrach und nun mikroskopische Präparate nach der angeführten Methode während verschiedener Perioden der noch nicht vollendeten Agglutination herstellte. Ich verfuhr zu diesem Behufe in der Weise, daß ich mehrere Röhrchen des gleichen Serums (Normal- und Immunserum) rasch hintereinander und möglichst gleichmäßig mit dem gleichen Mikrobenstamme impfte und gleichzeitig in den Thermostaten bei 37° C stellte. Das Normalserum wurde dabei unverdünnt oder in schwachen Verdünnungen (1 : 4 bis 1 : 10), das Immunserum¹⁾ gleichfalls unverdünnt oder in starken Verdünnungen (bis 1 : 15 625) verwendet. In kurzen Zwischenräumen (annähernd alle 5 Minuten) wurde ein Röhrchen dem Thermostaten entnommen, rasch mit Wasser in dem früher erwähnten Maße verdünnt, zentrifugiert und in der obigen Weise Präparate aus demselben angefertigt. Im allgemeinen stellte sich dabei heraus, daß, je hochwertiger das Serum war, auch in so kürzerer Zeit die ersten Erscheinungen der mikroskopischen Niederschlagsbildung an den Mikroben bereits nachweisbar waren. Die Immunsera vom Kaninchen und Meerschweinchen zeigten dementsprechend die gleichen Erscheinungen der Niederschlagsbildung an den isolierten Mikroben viel früher als die Normalsera der gleichen Tierart. Indessen erwies sich auch das unverdünnte Normalserum vom Rinde als im hohen Grade agglutinierend gegen Typhusbacillen und Choleravibrien; es konnten mit diesem Normalserum ganz analoge Resultate wie mit dem Immunserum erzielt werden, so daß tatsächlich die aus dem Normal- und Immunserum gewonnenen mikroskopischen Bilder untereinander keine irgendwie wesentlichen Verschiedenheiten erkennen ließen.

1) Es wurde mit zwei Kaninchentypus-Immunseris, von denen das eine noch bei einer Verdünnung von 1 : 50 000 nach 24 Stunden noch deutliche Agglutination zeigte, und mit zwei Meerschweinchencholera-Immunseris gearbeitet, von denen das eine noch bei Verdünnung von 1 : 15 625 agglutinierte.

(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. V. und VI

[Aus dem hygienischen Institute der deutschen Universität Prag
(Vorstand: Prof. Hueppe).]

Mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.

Von

Dozent Dr. **Oskar Ball** und Dozent Dr. **Alfred Pettersson**
Assistenten des Institutes. Stockholm.

V. Das Verhalten des Pferde- und Rattenserums gegen Milzbrandbacillen.

Von den in den früheren Abschnitten untersuchten Serumarten war das Kaninchenserum allein im stande, sowohl an sich Milzbrandbacillen abzutöten, als auch andere an sich unwirksame Sera zu ergänzen; mit anderen Worten, enthielt einzig das Kaninchenblut die zur Abtötung der Bacillen nötigen Komplemente, während Immunkörper (Ambozeptoren) bei den verschiedensten, natürlich widerstandsfähigen und empfänglichen Tieren nachgewiesen werden konnten. Nur selten fand sich eine höchst geringfügige milzbrandtötende Wirkung im Ochsen- und auch im Hühnerserum ¹⁾.

Außer dem Kaninchen liefern noch 2 Tiere in ihrem Blute reichlich Komplemente: die Ratte und das Pferd. Beide Blutarten enthalten außerdem entsprechende Immunkörper, so daß sie und zwar meist recht stark milzbrandtötend wirken. Daneben ergänzen sie, mehr oder minder gut, die gleichen Sera, welche auch durch Kaninchenblut sich aktivieren lassen.

Tabelle I.

Pferdeserum C, Rattenserum B für sich und mit Hühner-, Schweine- und Rindenserum gemischt untersucht. Als Kontrolle auch Mischungen mit Kaninchenserum (auszugsweise wiedergegebener Versuch).

		Sofort	Nach 4 Std.
1)	1 ccm Pferdeserum		0
2)	1 " "		33
3)	1 " Rattenserum		3
4)	1 " "	1/2 Std. 58°	5000
5)	1 " Kaninchenserum		0
6)	1 " "	1/2 Std. 58°	0
7)	1 " Hühnerserum		ca. 10 000
8)	1 " "	+ 0,05 ccm Pferdeserum	224
9)	2 " "	+ 0,05 " Rattenserum	0
10)	1 " "	+ 0,05 " Kaninchenserum	32
11)	1 " Ochsen- serum		4000
12)	1 " "	+ 0,05 " Pferdeserum	2
13)	1 " "	+ 0,05 " Rattenserum	0
14)	1 " "	+ 0,05 " Kaninchenserum	0
15)	1 " Schweineserum		1120
16)	1 " "	+ 0,05 " Pferdeserum	1
17)	1 " "	+ 0,05 " Rattenserum	0
18)	1 " "	+ 0,05 " Kaninchenserum	3

1) Dies beobachtete Pettersson bei Versuchen mit Hühnern in Stockholm. Bei den Prager Versuchen fehlte jede Bakterizidie. Rasseeigentümlichkeit?

Erwähnung verdient noch das Verhalten dieser beiden Serumarten beim $\frac{1}{2}$ -stündigen Erwärmen auf die übliche „Inaktivierungstemperatur“ von $56-60^{\circ}$. Bei Untersuchung einer größeren Anzahl Sera findet man die gleichen Abweichungen wie beim Kaninchen Serum: manchmal gelingt die Inaktivierung, ein anderes Mal aber nicht. Gerade in dem angeführten Versuche wurde das Rattenserum bei 58° unwirksam, das Pferdeserum ertrug diese Temperatur ohne wesentliche Schädigung. Ganz entsprechend ergänzte auch das erhitzte Pferdeserum noch die anderen Serumarten (gleichgültig ob diese ebenfalls erwärmt waren oder nicht), während das Rattenserum diese Wirkung verloren hatte.

Es scheint aber, als ob das regelmäßige Verhalten gerade umgekehrt wäre. Meist enthält das Blut von Pferden keine hitzebeständigen Komplemente, wohl aber das von Ratten. Ein durch Erhitzen unwirksam gemachtes Pferdeserum wird durch Zusatz geringer Mengen frischen Serums der gleichen Tierart sofort wieder milzbrandtötend.

Tabelle II.

		Sofort	Nach 4 Std.
1)	1 ccm Pferdeserum D		0
2)	1 " " " $\frac{1}{2}$ Std. 58°	} 585 i. M. 2005 i. M.	ca. 10 000
3)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " $58^{\circ} + 0,05$ ccm Pferdeser. D akt.		12
4)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " $58^{\circ} + 0,02$ " " " "		288
5)	1 " " " E		0
6)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " 58°	} 585 i. M. 2005 i. M.	ca. 8000
7)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " $58^{\circ} + 0,05$ ccm Pferdeser. E akt.		20
8)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " $58^{\circ} + 0,02$ " " " "		27

Tabelle III.

		Sofort	Nach 4 Std.
1)	1 ccm Rattenserum D		0
2)	1 " " " $\frac{1}{2}$ Std. 58°	} Mittel im Mittel 351	0
3)	1 " " " E		0
4)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " 58°		0
5)	1 " " Ochsen Serum $\frac{1}{2}$ " 58°		ca. 8000
6)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " $58^{\circ} + 0,02$ ccm Rattens. D akt.		0
7)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " $58^{\circ} + 0,02$ " " D $\frac{1}{4}$ St. 58°		4
8)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " $58^{\circ} + 0,02$ " " E akt.		1
9)	1 " " " $\frac{1}{2}$ " $58^{\circ} + 0,02$ " " $\frac{1}{2}$ St. 58°		0

Die Erscheinung, daß Rattenserum die halbstündige Erhitzung auf über 55° verträgt, ist bereits lange bekannt. Die erste Erwähnung dürfte sich bei Savtschenko¹⁾ finden.

Wieso gerade diese 3 voneinander so abweichenden Tiere den gleichzeitigen Reichtum ihres Blutes an Immunkörper und Komplement für Milzbrand erlangt haben, läßt sich vorläufig nicht einmal vermuten. Daß kein Zusammenhang der milzbrandtötenden Kraft des Blutes mit der natürlichen Immunität der blutliefernden Tiere besteht, wird aber dadurch neuerdings wieder klar.

VI. Die Menge des Immunkörpers im normalen Serum verschiedener Tiere.

Da das Verhalten des Serums verschiedener Tiere gegen Milzbrandbacillen ganz offenbar in keinem Zusammenhange mit der Empfindlichkeit dieser Tiere gegen die Milzbrandinfektion steht, so lag es nahe, in dem Gehalte eines Serums an Immunkörpern einen solchen Zusammenhang festzustellen. Es hatte sich sehr frühzeitig (zuerst beim Schafe)

1) Ann. de l'Inst. Pasteur. 1897. No. 12.

herausgestellt, daß nicht nur das Serum relativ immuner Tiere (Hund, Huhn), sondern auch das hochempfindlicher sich glatt durch Kaninchenserum ergänzen läßt, also Ambozeptoren besitzt, die einerseits in den entsprechenden Rezeptor des Milzbrandbacillus eingreifen, andererseits dem Komplemente des Kaninchen-, Ratten- und Pferdeserums Anlage ermöglichen. Aber — und dieser Gedanke, der zufällig durch einige Versuche am Anfange bestätigt schier, wurde lange Zeit vergeblich verfolgt — es wäre denkbar gewesen, daß ein größerer Gehalt an solchen Ambozeptoren dem Serum natürlich immuner Tiere eigen sei und in Zusammenhang mit ihrer Unempfindlichkeit stände.

Ein Mittel, diesen Gehalt quantitativ zu bestimmen, bietet die Absorption mittels Milzbrandkulturen dar, auf welche schon wiederholt verwiesen wurde¹⁾.

Es stellte sich heraus, daß diese Menge der (meist bei 100° abgetöteten) Milzbrandkulturen, welche man einem immunkörperhaltigen, normalen Serum zusetzen muß, um demselben die Ergänzungsfähigkeit durch Kaninchenserum zu nehmen, eine sehr schwankende ist, nicht nur für verschiedene Arten, sondern auch für Individuen der gleichen Art, daß aber auch hier eine Beziehung zur natürlichen Immunität nicht gesucht werden kann²⁾.

Das auffälligste Verhalten zeigt dabei das Rinderserum, also das eines Tieres, das nach dem Schafe vielleicht am allermeisten der Milzbrandinfektion ausgesetzt ist. Mit Ausnahme eines einzigen Falles gelang es niemals, 1 ccm Rinderserum durch Milzbrandbacillen zu erschöpfen. Auch eine ganze Agarkultur auf 1 ccm genügte nicht. Selbst dann, wenn Milzbrandbacillen im Serum 12—20 Stunden gewachsen waren, ließ sich dasselbe nach Entfernung der Bacillen auf der Zentrifuge noch ergänzen.

Umgekehrt wurde das Serum des sehr widerstandsfähigen Schweines meist durch viel geringere Mengen, $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{2}$ tote Agarkultur für 1 ccm, seines Immunkörpergehaltes beraubt.

Hundeserum zeigte die allergrößten Schwankungen, ebenso Schafserum. Nur das Hühnerserum stimmte einigermaßen zu der Annahme, in welcher die Versuche begonnen wurden. Denn fast immer war es nur sehr schwer seiner Immunkörper zu berauben.

Tabelle I.

Zur Absorption werden je 3 ccm Ochsenserum mit bei 100° abgetöteten Milzbrandagarkulturen behandelt und zwar:

Ochsenserum	a)	3 ccm	+	$\frac{3}{10}$	}	Agarkulturen
	b)	3	„	$\frac{3}{10}$		
	c)	3	„	$\frac{3}{5}$		
	d)	3	„	3		

Nach 1-stündigem Aufenthalte bei 37°, wobei starke, typische Agglutination erfolgt, werden die Bakterien abzentrifugiert:

		Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Ochsenserum		Mittel	10 000
2) 1 „ „ + 0,05 ccm Kaninchenserum	a	Mittel	0
3) 1 „ „		Mittel	10 000
4) 1 „ „ a + 0,05 ccm Kaninchenserum		Mittel	0
5) 1 „ „ b + 0,05 „ „		Mittel	0
6) 1 „ „ c + 0,05 „ „		Mittel	0
7) 1 „ „ d + 0,05 „ „		Mittel	0

1) Bail, Dieses Centralbl. 1903. No. 5. — Petterson, Ibid. No. 8.

2) Jedenfalls sind die Kulturmassen, die man zur Erschöpfung braucht, sehr groß, wenn man sie mit den geringen Mengen von z. B. Staphylokokkenkulturen vergleicht, welche die Sera unwirksam machen können.

Tabelle II.

Zur Absorption werden, wie in der vorigen Tabelle, hergestellt:

	Schweinesera	a) 2 ccm + $\frac{2}{5}$	} Agarkulturen		
	"	b) 2 " + $\frac{2}{2}$			Sofort
1)	1 ccm Schweineserum				10 000
2)	1 " "	+ 0,05 ccm Kaninchenserum		1408	0
3)	1 " "	a			10 000
4)	1 " "	a + 0,05 ccm Kaninchenserum			250
5)	1 " "	b			} ca. 10 000
6)	1 " "	b + 0,05 ccm Kaninchenserum			

Tabelle III.

Zur Absorption werden, wie in der ersten Tabelle, hergestellt:

	Hühnerserum	a) 2 ccm + $\frac{2}{5}$	} Agarkulturen		
	"	b) 2 " + $\frac{2}{2}$			Sofort
	"	c) 2 " + 2			
1)	1 ccm Hühnerserum				10 000
2)	1 " "	+ 0,1 ccm Kaninchenserum		1582	6
3)	1 " "	a + 0,1 ccm Kaninchenserum			149
4)	1 " "	b + 0,1 " "			168
5)	1 " "	c + 0,1 " "			29

Nachdruck verboten.

Experimentelle Beiträge zur Formaldehyd-Wasserdampf- desinfektion.

[Aus dem hygienischen Institute der Universität Zürich.]

Von **Hans Herzog**.

Mit 2 Figuren.

Unsere einfachsten Desinfektionsmittel sind der strömende Wasserdampf und die heiße Luft. Das eigentliche Agens ist hierbei nicht die Temperaturerhöhung an und für sich, sondern im ersteren Falle ist es das Wasser, denn „heißes Wasser darf mit Recht als ein mit starken chemischen Kräften ausgestatteter Körper betrachtet werden, der auf sehr viele organische Verbindungen zersetzend einwirkt“ (Behring); im zweiten Fall wirkt nicht die trockene Hitze, sondern die heiße Luft und speziell der Sauerstoff.

Der strömende Wasserdampf hat den Nachteil, daß er die Objekte stark durchnäßt, viele Gegenstände beschädigt und Blut- und Eiterflecken durch Eiweißgerinnung einbrennt. Die heiße Luft ruiniert ebenfalls viele Gegenstände und wirkt zudem weniger bakterizid. Ausgehend von diesen beiden Prinzipien, dem strömenden Wasserdampf und der erhitzten Luft, suchte man die Desinfektionsmethoden zu verbessern.

Statt des Wasserdampfes nur kaltes Wasser, welchem chemisch wirkende Desinfizientien zugesetzt wurden, zu nehmen, erwies sich in den meisten Fällen als irrationell. Walter (38) taucht Kleidungsstücke und Ledersachen 24 Stunden lang in eine 1-proz. Formollösung. Förster (10) empfiehlt das Einlegen der Wäsche in eine 10-fache Verdünnung von Kreosolwasser.

Nachdem Koch (18), Behring (4), Heider (15), Pottevin (26) u. a. nachgewiesen, daß mit einer Steigerung der Temperatur die des-

infizierende Kraft solcher wässerigen Lösungen rapid zunimmt, traten auch diese in die Reihen der brauchbaren Desinfektionsmittel ein. Behring empfiehlt 1,4 Proz. Soda enthaltende Waschlaugen, Heider heiße Lysollösungen von 0,5—2 Proz., Nocht (23) eine 3—5-proz. Karbolsäurelösung von 40—50°. Zur Desinfektion von mit Blut, Eiter und Kot beschmutzter Wäsche sind diese Verfahren entschieden von Vorteil, indem Verunreinigungen sich lösen, so daß, falls die Wäsche kalt eingeweicht wird, keine Flecken eingebrannt werden.

Da die heiße Luft erst bei hoher Temperatur und bei langer Dauer sicher keimtötend wirkt, beschädigt sie die zu desinfizierenden Objekte.

Nun hat aber Schumburg (32) in neuerer Zeit ein Desinfektionsverfahren empfohlen, mittels dessen er auch feinere Kleider, Leder u. s. w., ohne sie zu schädigen, desinfizieren will, solange keine sporentragenden Bakterien (Milzbrand und Tetanus) in Betracht kommen. Der genannte Forscher geht vom Prinzip der Heißluftsterilisation aus; statt der trockenen heißen Luft kommt aber feuchte heiße Luft zur Anwendung. Durch gleichzeitiges Verdunsten von Wasser soll die mechanische Bewegung der Luft und infolgedessen ihr Eindringen in die Objekte befördert werden. Immerhin darf der Feuchtigkeitsgehalt der Luft gewisse Grenzen nicht überschreiten, da sonst Ledersachen schrumpfen. „Bei einer relativen Feuchtigkeit von 60 Proz. scheint die Zone für die feuchte Luft von 100° getroffen zu sein, in welcher einerseits die sporenfreien pathogenen Keime zu Grunde gehen, andererseits Leder nicht angegriffen wird.“ Die Methode wird zur Zeit noch weiter geprüft.

Schon früher wurden statt der heißen Luft verschiedene chemisch wirkende Gase zu Desinfektionszwecken benutzt, so das Chlor, die schweflige Säure und das Brom. Von der schwefligen Säure, welche ganz besonders von der Hamburger Cholerakommission empfohlen worden war, sagt Behring (4), „daß das Gas bei einer Versuchsdauer und Dosis, welche die Praxis im äußersten Falle noch zuläßt, in die größeren Verkehrsgegenstände wie Ballen und Bunde nicht tief genug eindringt“.

Die genannten Gase wurden mit der Zeit aus der Desinfektionspraxis verdrängt durch das Formaldehydgas, welches sich speziell für die Zimmerdesinfektion als geeignet erwies. Es kommt hierbei neben der spezifisch bakteriziden Wirkung dieses Gases noch besonders die annähernde Gleichheit der spezifischen Gewichte von Luft und Formaldehyd in Betracht, wodurch die Verteilung desselben im Raume erleichtert wird. Die unzähligen Versuche, welche mit dem Trillatschen Autoklaven, dem Schering'schen Aeskulap, dem Lingnerschen Glykoformalapparat, den Karboformalgühblocks, den Sprayapparaten von Prausnitz und von Czaplewski und dem Apparat von Flüge angeestellt worden sind, ergaben gute Resultate, aber nur was die Oberflächendesinfektion anbelangt.

Um nun mit gasförmigen Desinfizientien Tiefenwirkung zu erzielen, wurde das Vakuum zu Hilfe genommen. Man hoffte, daß, nachdem die Luft aus den zu desinfizierenden Objekten herausgezogen wäre, das Gas in genügender Menge in die Tiefe derselben eindringen würde; allein auch hier entsprach, wie wir später sehen werden, der Erfolg den Erwartungen selbst dann nicht, wenn das Gas unter erhöhtem Drucke in einen luftverdünnten Raum einströmte.

Einen prinzipiell wichtigen Fortschritt stellt die Methode von Esmarch (8) dar. An die Stelle des trockenen Formaldehyddampfes

tritt der strömende Formaldehydwasserdampf, eventuell in Verbindung mit dem Vakuum.

Bevor wir näher auf die Methode eintreten, werfen wir einen kurzen Ueberblick auf die Entwicklung und den gegenwärtigen Stand der Formalindesinfektion mit Ausschluß der Zimmerdesinfektion.

Der im Jahre 1869 von Hofmann entdeckte Aldehyd der Ameisensäure oder Formaldehyd (CH_2O) ist ein farbloses, stechend riechendes Gas, welches beim Abkühlen sich zu einer farblosen, bei -21° siedenden Flüssigkeit verdichtet und das leicht in Wasser löslich ist. Seine antiseptischen Eigenschaften wurden erst 1892 fast gleichzeitig von Trillat und von Aronson geprüft. Wie die Aldehyde im allgemeinen, polymerisiert auch der Formaldehyd sehr leicht; hierdurch entstehen feste Körper, der Paraformaldehyd (CH_2O)₂ und das Trioxymethylen (CH_2O)₃; die aktive Substanz hat sich in eine inaktive verwandelt (Bombicci) [5]. Das Formalin des Handels ist die konzentrierte 40-proz. Formaldehydlösung. Sobald diese Lösung über 40 Proz. hinaus eingedampft wird, scheidet sich eine weiße Masse aus, bestehend aus den eben genannten Polymeren. Um diese für die Praxis höchst unangenehme Polymerisation zu verhüten, wurden dem Formalin gewisse Substanzen zugesetzt wie Chlorcalcium (Chloroformol von Trillat), Menthol (Holzin von Rosenberg), Glycerin (Glykoformal von Walther-Schlossmann), oder es wurde das Formalin unter hohem Druck gesetzt (Trillat) oder stark verdünnt (Flügge). Basierend auf diesem großen Fortschritte, nahm dann die Zimmerdesinfektion einen raschen Aufschwung und gab befriedigende Resultate.

Nicht dasselbe kann man behaupten betreffs Desinfektion von Kleidern, Leder, Pelzwaren, Seidenstoffen, Büchern, Bürsten, Kämmen und einer Menge anderer Gegenstände, welche den strömenden Wasserdampf nicht vertragen. Zum großen Teil werden solche Gegenstände vor der Ankunft der Desinfektoren von den Leuten verborgen, weil diese fürchten, daß ihr Eigentum im Wasserdampfe verdorben werde. Läßt man aber genannte Objekte in dem mit Formaldehyd zu desinfizierenden Zimmer zurück, so werden sie nur unvollständig sterilisiert und halbe Desinfektion ist unter Umständen schlimmer als gar keine.

Im Jahre 1893, also noch zur Zeit der ersten Formalinbegeisterung, gab Lehmann (20) eine Methode der Kleiderdesinfektion an, welche jedermann gestatten würde, zu Hause die Kleider auf die einfachste Weise selbst zu sterilisieren. Die Kleider wurden von Lehmann in eine Kiste gebracht und hier 12 Stunden lang bei gewöhnlicher Zimmertemperatur Dämpfen ausgesetzt, welche sich aus 15 g Formalin entwickelten, oder es wurden mit Formalin getränkte Tücher zwischen die Kleider gelegt. Milzbrandsporen, welche in strömendem Wasserdampf 7—8 Minuten lebend geblieben waren, sollen hierbei abgetötet worden sein. Das Verfahren war auch für Lederwaren, Bürsten, Bücher u. s. w. berechnet.

Frank (11 u. 12) empfiehlt zur Desinfektion von tierischen Haaren, Fellen u. s. w. Alkoholdämpfe oder als noch besser wirkend, Dämpfe des Spiritusvorlaufs, welchen er ein ganz besonders intensives Penetrationsvermögen zuschreibt. Das zu desinfizierende Material befindet sich in einem metallenen Behälter, welcher auf $65-70^\circ$ erwärmt wird und in welchem Alkoholdämpfe 4 Stunden lang auf die Objekte einwirken. Am wirksamsten zeigten sich Dämpfe, welche aus 40-proz. Alkohol entwickelt wurden.

Abba und Rondelli (1) desinfizieren Frauenkleider, Pelzsachen, Hüte u. s. w. in einem besonderen Raume derart, daß jene an einem von der Decke herabhängenden rotierenden Metallkranze aufgehängt und so den Formaldehyddämpfen ausgesetzt werden; der Raum selbst kann bis auf 80° erhitzt werden.

Nach der Methode von Petruschky (25) werden alle wertvollen Kleider und andere Gegenstände, welche den strömenden Wasserdampf nicht vertragen, in einem fest verschlossenen Schranke durch eine sehr große Menge Formaldehyd (400 g = 1000 ccm Formalin), welcher durch eine Oeffnung von außen eingeleitet wird, desinfiziert. Hinz (18), welcher die Methode prüfte, fand bei Anwendung von 2 l Formalin nach 2-stündiger Einwirkung Kleider und auch Pelzsachen keimfrei; dagegen waren trotz der großen Formalinmenge Milzbrandsporen in einer Stiefelspitze und in einem Besen lebend geblieben. Aehnliche Versuche wurden mit dem Sprayapparat von Prausnitz gemacht. Nicht sporentragende Bakterien wurden abgetötet, Sporen aber, sowie auch Pediculi, blieben am Leben.

Das Verfahren von Petruschky wurde wesentlich vereinfacht von Rositzky (29). Statt des teuren Trillatschen Autoklaven benutzt letzterer einen einfachen Dampftopf. Vom diesem aus wird der Dampf in das Innere eines Schrankes zu einem Gefäß mit Sprayvorrichtung geleitet; im Gefäße befindet sich Formalin, welches durch den unter einer gewissen Strömung eindringenden Dampf direkt nach aufwärts versprays wird. Die Desinfektionsdauer beträgt 9 Stunden; für einen Schrank von 1 cbm Rauminhalt braucht es 100 ccm 40-proz. Formaldehydlösung. Das Verfahren kommt in Danzig und, mit geringen Modifikationen, in der Grazer Desinfektionsanstalt zur Anwendung.

Walter (37 u. 38) beschreibt einen Apparat, mittels dessen er Kleider, besonders Uniformen, bei 50—70° desinfiziert. Aus einem Autoklaven mit 3—3½ Atmosphären Ueberdruck werden Dämpfe von Formochlorol in einen Blechkasten (130:50 cm) eingeleitet. Der Blechkasten ist von einem Mantel aus demselben Material umgeben und kann durch Einleiten von Wasserdampf aus einem Maschinenkessel erwärmt werden. Das Verfahren ergab gute Resultate und diese zeigten keine bedeutende Differenz, ob gleichzeitig noch Luft abgesogen wurde oder nicht.

Merkel (22) prüfte die Methode einer französischen Gesellschaft in Marseille nach (wohl das Verfahren der Société chimique des Usines du Rhône). Er benutzte zu seinen Versuchen den gewöhnlichen Desinfektionsapparat (3:2 m) einer Pinselfabrik. Es wurden Borsten mit Milzbrandsporen imprägniert und ins Innere von großen Borsten- und Roßhaarpaketen gesteckt. Im Apparate wurde ein Vakuum, entsprechend 680 mm Quecksilberdruck, geschaffen und aus einem Autoklaven wurden 3 Stunden lang unter 3 Atmosphären Ueberdruck Formaldehyddämpfe eingeleitet. Trotz dieser komplizierten Einrichtung bekam Merkel ein völlig negatives Resultat.

Dasselbe Verfahren wurde auch nachgeprüft von Dunbar und Musehold (7). Die zu desinfizierenden Roßhaare wurden in losem Zustande unter gewöhnlichem Druck, in Ballen unter vermindertem Druck (60 statt 760 mm) den Dämpfen von Formochlorol ausgesetzt. Sobald der Desinfektionsraum (10 cbm) mit Formaldehyddämpfen gesättigt war, wurde das Einströmen der Dämpfe unterbrochen; die Borsten- und Roßhaarbündel blieben noch 12—16 Stunden in Kontakt

mit den Formaldehyddämpfen. Die Resultate stimmen mit denjenigen von Merkel überein. Die in einer Tiefe von 10 cm in Roßhaarpaketen untergebrachten Milzbrandsporen von mittlerer Resistenz waren nicht abgetötet worden. Das Innere der Borstenbündel hatte sich für Formaldehyddämpfe leichter zugänglich erwiesen. Die Mängel des Verfahrens beruhen nach Dunbar und Musehold darauf, „daß durch die Anwendung des Vakuums das Eindringungsvermögen des Formaldehyds nicht in einem für den besonderen Zweck ausreichenden Grade gesteigert wird, und daß der in den Desinfektionsraum zuströmende Dampf sich ungleichmäßig verteilt, nämlich in der Hauptsache sich in den unteren Teilen des Desinfektionsraumes sammelt“.

Einen Apparat auf demselben Prinzip beruhend und wohl das Vorbild für denjenigen der Société chimique des Usines du Rhône, beschrieb 1897 der Amerikaner Kinyoun (17) als Modifikation seines schon 1895 konstruierten Desinfektionsapparates. Auch hier soll das Vakuum es gestatten, das Formaldehydgas zur Desinfektion dichter, schwer durchdringbarer Objekte zu verwenden. Da der von Kinyoun angegebene Apparat, soviel ich ersehen konnte, in der deutschen Literatur bis jetzt keine Erwähnung gefunden hat, lasse ich eine kurze Beschreibung desselben folgen: An der Seite eines cylinderförmigen Desinfektionsraumes befinden sich 2 kleine Cylinder; der eine derselben ist aus Kupfer, der andere aus Eisen; damit die darin enthaltenen Flüssigkeiten bequem erhitzt werden können, sind beide kleinen Cylinder, die sogenannten „boilers“, mit Dampfrohren umwickelt; überdies sind sie mit Ein- und Ausflußrohren sowie mit Manometern versehen. Die Ausflußrohren beider boilers münden durch eine gemeinsame Oeffnung in den Behälter. Der Kupfercylinder wird mit Formochlorol, der eiserne mit Ammoniak gefüllt; mit letzterem sollen nach vollendeter Desinfektion die Objekte desodoriert werden. Nachdem der Desinfektionsraum mit den zu desinfizierenden Gegenständen besetzt und gut verschlossen worden, wird die Luft aus demselben abgesogen, bis der Atmosphärendruck auf die Hälfte gesunken ist. Während dieser Zeit läßt man durch die Dampfrohrenrolle, welche den kleinen kupfernen Cylinder umgibt, Dampf strömen, bis das Manometer den gewünschten Druck angibt; alsdann wird der Hahn geöffnet und das Formaldehydgas stürzt mit Vehemenz in den Desinfektionsraum. Auf diese Weise kann man in letzterem leicht jeden beliebigen Prozentsatz Formaldehyd erhalten und daher auch die Desinfektionszeit nach Wunsch regulieren. Vor allem unterscheidet sich der Apparat Kinyouns von denjenigen, welche von Dunbar und Musehold sowie von Merkel benutzt wurden, dadurch, daß durch Vorwärmung des Mantels die Temperatur im Innern des Desinfektionsapparates bis auf 85° gesteigert werden kann, eine Temperatur, welche man mit den in Europa gebräuchlichen Apparaten nicht erreicht. Kinyoun benutzt seinen Apparat besonders zur Desinfektion von gepolsterten Möbeln, Matratzen, Büchern, Pelzen und feineren Textilarbeiten.

Diese kurz beschriebenen Methoden sind entweder zu wenig wirksam oder sie arbeiten mit zu teuren Apparaten, wie dasjenige von Walter, von der Société des Usines du Rhône, von Petruschky, welche letztere Methode zudem sehr teuer im Betriebe ist, da der Apparat kolossale Mengen Formaldehyd verbraucht, auch das Französische Verfahren dürfte ziemlich kostspielig sein. Schon mehr für die Praxis geeignet scheinen die Verfahren von Abba und Rondelli sowie dasjenige von Rositzky;

allein auch diese arbeiten zu langsam, unter Umständen auch zu unsicher und wurden mit zu wenig resistenten Testobjekten geprüft. Bei der amerikanischen Methode ist der teure Trillatsche Autoklav durch einen kleinen kupfernen Cylinder ersetzt. Um eine Temperatur von 85° im Innenraum zu erhalten, ist es erforderlich, einen dickeren, widerstandsfähigeren Mantel an dem Desinfektionsapparat anzubringen, was den Preis der Anlage etwas erhöht.

Alle genannten Desinfektionsverfahren nehmen zum Ausgangspunkte das Formaldehydgas; demselben werden zur Verstärkung seiner Wirkung Wasserdämpfe beigegeben. Kokubo (19), ein Schüler v. Esmarchs, geht umgekehrt vom 100-grädigen Wasserdampf aus, dessen desinfizierende Kraft er durch Zusatz verschiedener Substanzen zu erhöhen sucht. Kokubo kommt zu dem überraschenden Resultate, daß durch Zusatz minimaler Mengen von Formaldehyd zum strömenden Wasserdampf die Desinfektionswirkung des letzteren kolossal gesteigert wird. Ein Kartoffelbacillus, der dem strömenden Wasserdampf 130 Minuten widerstanden hatte, ging nach Zusatz von 0,1 Proz. Formaldehyd bereits nach 7 Minuten zu Grunde.

v. Esmarch (8) hat nun auf diesem Prinzipie die neue Methode aufgebaut. Seine Versuche ergaben:

Daß man durch Formaldehydzusatz zum 100-grädigen Wasserdampf die Desinfektionszeit für umfangreiche, dichte und zusammengepreßte Objekte bedeutend abkürzen könne;

daß auch bloß 70—80-grädiger Wasserdampf bei Zusatz geringer Mengen von Formaldehyd freie Sporenfäden sehr rasch sterilisiert;

daß durch 70—80-grädigen Formaldehydwasserdampf eine bedeutende Tiefenwirkung erzielt werden kann, falls gleichzeitig die Luft mit gewisser Intensität abgesogen wird.

Auf Grund dieser Resultate empfiehlt v. Esmarch die Verwendung von 70—80-grädigem Formaldehydwasserdampf in Verbindung mit einem geringen Vakuum als allgemeine Desinfektionsmethode. v. Esmarch selbst hat seine Methode mit weniger widerstandsfähigem Materiale geprüft, und ich folgte daher gern der Einladung meines verehrten Lehrers, Herrn Dozent Dr. Silberschmidt, die Resultate der beiden Forscher, v. Esmarch und Kokubo, nachzuprüfen.

I.

Nachdem mehrere Vorversuche in einem improvisierten Apparate ermutigende Resultate gegeben, ging ich zuerst an die Prüfung freier, d. h. nicht eingewickelter Seidenfäden. Letztere wurden nach Behring (4) so hergestellt, daß 5—6 Tage alte Kartoffel- oder Agarrekulturen mit einem ausgeglühten Platinspatel abgeschabt und in sterilem destillierten Wasser verrieben wurden. In diese Aufschwemmung kamen Seidenfäden, die im Autoklaven sterilisiert worden waren, über 1 Stunde lang zu liegen; dann wurden sie einzeln herausgenommen, in sterile mit Filtrierpapier austapezierte Petri-Schalen gelegt und mehrere Tage bei 40° im Brutschrank gelassen. Zur Prüfung der so hergestellten Sporenfäden stand mir ein kleiner Desinfektionsapparat, eine Art Kochscher Topf, zur Verfügung, der seiner Zeit von Prof. Roth zu seinen Versuchen benutzt worden war. Die Seidenfäden wurden zu 4—5 zwischen zwei sterile Klötzchen aus Hartholz dadurch eingekleimt, daß die beiden Klötzchen durch Klammern zusammengepreßt wurden. In der Mitte

der einen Klammer war ein Bindfaden befestigt, und am Ende dieses Bindfadens hing ein Gegengewicht.



Sobald das im Deckel des Apparates steckende Thermometer die Siedetemperatur zeigte (in Zürich 98,5°), wurden die Klötzchen mit den eingekeilten Seidenfäden rasch und unter möglichst wenig Dampfverlust der Innenwand des Apparates nach bis zu halber Höhe hinabgelassen, so daß die Fäden frei in das Lumen des Apparates hineinragten. Das Gegengewicht hing an der Außenwand herunter. Nach Ablauf einer bestimmten Anzahl Minuten wurde der Deckel auf der betreffenden Seite gelüftet und ein bestimmtes Klötzchen herausgezogen. Die Sporenfäden wurden mit ausgeglühter Schere abgeschnitten, in sterile Bouillon gebracht und 10 Tage lang täglich im Brutschranke kontrolliert.

Es wurden auf diese Weise geprüft: Ein Milzbrandbacillus vom Pferd (Milzbrand—Pferd), ein Milzbrandbacillus gewonnen aus der Pustula maligna eines Patienten und auf eine Maus überimpft (Milzbrand—Maus), ferner Seidenfäden, welche Herr Prof. Egli im Jahre 1893 mit *Subtilis* imprägniert hatte (*Subtilis* 1893) und endlich ein Kartoffelbacillus, der vor einiger Zeit aus einer 8 Jahre lang aufbewahrten Büchse mit unversehrter kondensierter Milch isoliert worden war (*Mesentericus vulgatus* II aus Milch).

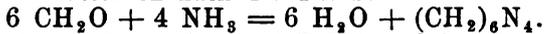
Seidenfäden, mit Sporen der genannten Bakterienarten infiziert, wurden im kochenden Wasser, im strömenden Wasserdampf und in Formaldehydwasserdampf verschiedener Konzentration geprüft. Die Resultate, mit denjenigen von Kokubo übereinstimmend, veranschaulicht folgende Tabelle I:

Tabelle I.
Versuche mit freien Sporenfäden.

Bakterienart	strömender Wasser- dampf	kochendes Wasser	Formaldehydwasserdampf		
			0,1 Proz.	0,5 Proz.	1,0 Proz.
Kein Wachstum mehr nach:					
Milzbrand—Pferd	4—5 Min.	2 Min.	1 Min.	1 Min.	1 Min.
Milzbrand—Maus	9—10 „	4—5 „	2—3 „	1 „	1 „
<i>Subtilis</i> 1893	130 „	45 „	8—10 „	3—5 „	2—3 „
Mesent. aus Milch II	150 „	60 „	10—15 „	5—6 „	2—3 „

Zu diesen Versuchen wurde 40 Proz. Formalin (Originalflasche von Schering) verwendet. Die Fäden wurden immer in Bouillon überimpft, da nachgewiesen ist, daß die Resultate genauer sind als bei Verwendung fester Nährböden. R. Koch (18) gibt die Vorschrift, man solle, damit nicht die Probe dem Nährboden zu viel von dem Desinfektionsmittel zuführt, wodurch das Bakterienwachstum verhindert werden kann, einerseits die Probe möglichst klein nehmen und andererseits das Desinficiens vor dem Ueberimpfen aus der Probe zu entfernen suchen. Trotz diesem Rate zog ich es vor, zu jedem Versuche 4—5 Sporenfäden zu verwenden, um rascheres Wachstum und möglichst übereinstimmende Resultate zu erhalten. Ueber letzteren Punkt bemerkt

Behring (4) in Uebereinstimmung mit Pottevin und Geppert: „Auch die Zahl der an dem Seidenfaden haftenden Sporen ist auf das Resultat der Prüfung von Einfluß, weil die einzelnen Sporen nicht die gleiche Widerstandsfähigkeit besitzen und weil die Wahrscheinlichkeit, sehr widerstandsfähige Exemplare am Seidenfaden vorzufinden, um so größer ist, je mehr Sporen demselben anhaften“. Um die Sporenfäden von etwa noch anhaftendem Formaldehyd zu befreien, wurden sie vor der Ueberimpfung in sterilem destillierten Wasser, dem wenig Ammoniak beigefügt war, geschwemmt. Auf diese Weise soll unwirksames Hexamethylentetramin entstehen nach der Formel:



Bei den späteren Versuchen mit Paketen, Schuhen u. s. w. wurden die Fäden direkt überimpft, da besonders angestellte Versuche keine Wachstumsdifferenz zwischen neutralisierten und nicht neutralisierten Sporenfäden ergaben. Schumburg (31) behauptet übrigens, gestützt auf zahlreiche Experimente, daß Formaldehyd mehrere Stunden in Berührung mit Ammoniak bleiben müsse, bis Hexamethylentetramin entstehe. Das einzige Mittel, um einen Einfluß des übertragenen Formaldehyds auf das Versuchsergebnis auszuschließen, bleibt demnach die alte Kochsche Empfehlung einer gehörigen Verdünnung durch Anwendung kleiner Objekte (Fäden, Glasperlen) und großer Mengen flüssigen Nährmaterials. Der Prozentgehalt der verwendeten Lösungen bezieht sich stets auf das darin enthaltene Formaldehydgas, nicht auf das Formalin. Wenn z. B. von 1-proz. Formaldehydwasserdämpfen gesprochen wird, so ist dies so zu verstehen, daß auf 1 l der zu verdampfenden Lösung 25 ccm Formalin (40-proz.) kommen. Die Versuche von Brun n (6) geben des weiteren darüber Auskunft, in welchem Verhältnis Formaldehyd einerseits und Wasserdampf andererseits aus einer stark verdünnten Formaldehydlösung verdampfen. Bei einer Konzentration über 8 Proz. verdunstet mehr Wasser als Formaldehyd, bei Konzentration unter 8 Proz. mehr Formaldehyd. „Je verdünnter die Ausgangslösung, um so mehr Formaldehyd entweicht und kann für die Desinfektion nutzbar gemacht werden.“ Dieser Satz erklärt zum Teil die öfter beobachtete Tatsache, daß für kurz dauernde Versuche mit schwachen Formaldehydlösungen die Konzentration wenig in Betracht kommt. So fand auch Kokubo (19) die Widerstandsfähigkeit seines Kartoffelbacillus gegen Formaldehydwasserdämpfe von 0,5, 1,0, 2,0 und 3,0 Proz. kaum 1 Minute variierend.

II.

In zweiter Linie handelte es sich darum, festzustellen, ob auch bei niedrigerer Temperatur bedeutende Unterschiede bestehen in der keimtötenden Wirkung des Wasserdampfes und des Formaldehydwasserdampfes. Als Testobjekte wurden außer den schon genannten Bakterienarten noch benutzt: Ein gewöhnlicher Kartoffelbacillus (*Mesentericus* I), ein *Staphylococcus pyogenes aureus* und ein *Subtilis*, gewonnen aus einer nach Eisensplittersverletzung entstandenen Panophthalmie und als deren spezifischer Erreger beschrieben von Bänziger und Silberschmidt (33). Ich wählte zu diesen Versuchen die Temperatur von 70°, weil diese für die später zu erörternde Frage der Desinfektion von Leder, Seide und Pelzsachen besonders in Betracht kommt. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle II.

Widerstandsfähigkeit von infizierten Seidenfäden in Wasserdampf von 70° mit und ohne Formaldehyd.

Bakterienart	30 Min. in Wasserdampf	30 Min. in 0,1-proz. Formaldehydwasserdampf	3 Stdn. in Wasserdampf	15 Min. in 1,0-proz. Formaldehydwasserdampf
Staphylococcus aureus	+	—		
Milzbrand—Pferd	+	—		
Milzbrand—Maus	+	—		
Mesent. vulg. I	+	—		
Subtil.—Panophthalm.	+	+		
Subtilis 1893	+	+	+	—
Mesent. vulg. II.—Milch	+	+	+	—

Milzbrand—Maus in 1,0 Proz. Formaldehydwasserdampf von 70°:
nach 3 Minuten +
" 4 " —

III.

Behufs Prüfung der Tiefenwirkung von Formaldehydwasserdämpfen verschiedener Konzentration benutzte ich möglichst widerstandsfähige Testobjekte, nämlich Sporen vom Milzbrandbacillus—Maus, welche im strömenden Wasserdampf 9 Minuten, im kochenden Wasser 4 Minuten lang lebend geblieben waren, und den Subtilis 1893, dessen Sporen im Wasserdampf erst nach 130 Minuten, im kochenden Wasser erst nach 45 Minuten abgetötet wurden. Der Mesentericus—Milch II, welcher bei den früheren Versuchen die resistentesten Sporen gezeigt hatte, erwies sich in Aufschwemmungen anderer Kulturen als weniger widerstandsfähig. Was die Wahl der Testobjekte für Formaldehydversuche betrifft, sind die Ansichten der Autoren wesentlich verschieden. Die Mehrzahl derselben erklärt sporenhaltiges Material und unter den pathogenen Mikroorganismen den Milzbrand als am widerstandsfähigsten gegenüber Formaldehydeinwirkung. Im Gegensatz hierzu wollen Hammer und Feitler (14) geradezu eine elektive Wirkung des Formaldehyds auf Milzbrand beobachtet haben. Abba und Rondelli (1) sowie auch Reichenbach (27), Walter (37) u. a. fanden eine mangelhafte bakterizide Wirkung des Formaldehyds gegenüber nicht über 4 Wochen alten Staphylokokkenfäden. Ottolenghi (24) fand die Wirkung einer Formalinlösung 10 : 100 auf tuberkulösen Auswurf mangelhaft. Spengler (35) hält eine Vernichtung der Tuberkelbacillen nach der Flüggeschen Formalindesinfektionsmethode für ausgeschlossen und verlangt, daß Tuberkelbacillen als Testobjekte benutzt werden. (Nach Spenglers Ansicht ist der Tuberkelbacillus im Gegensatz zu anderen Sputumbakterien so widerstandsfähig gegen Formaldehyd, daß sich letzterer zur Isolierung von Tuberkelbacillen und Tuberkelbacillensplittern aus Bakteriengemischen sowie zu deren Züchtung eignet). Sitsen (34) betont, „daß die Widerstandsfähigkeit der vegetativen Formen der Bakterien durch das Trocknen anfangs zunimmt und erst bei fortschreitender Austrocknung wieder abnimmt. Die Zunahme der Widerstandsfähigkeit ist um so größer, je besser der Organismus das Trocknen aushält“. Es liegt die Annahme nahe, daß die Beobachter, welche nicht sporentragende Bakterien, wie Staphylokokken, dem Formaldehyd gegenüber widerstandsfähiger fanden als Milzbrandsporen, mit

sehr wenig resistenten Milzbrandsporen gearbeitet haben. Die mir zur Verfügung stehenden Staphylokokken gingen sowohl im strömenden Wasserdampf als auch im Formaldehydwasserdampf von 70° rasch zu Grunde.

Neben den Sporen von Milzbrand—Maus wurden stets noch solche von dem viel resistenten Subtilis 1893 verwendet, um den Grad der desinfizierenden Wirkung da noch weiter kontrollieren zu können, wo jener abgetötet wurde. Ueber diesen Punkt bemerkt Reischauer (28): „Jetzt aber, wo man weiß, daß die Erreger der Pest, der Cholera, der Diphtherie, der Tuberkulose, der Influenza und des Typhus viel weniger resistent sind als die Milzbrandsporen, braucht man von einem Desinfektionsmittel nicht zu verlangen, daß es auch Sporen von Kartoffel- und Heubacillen abtötet, sondern kann sich mit einer sicheren Wirkung auf die praktisch in Betracht kommenden begnügen. Unter diesen kennt man freilich die Erreger der Pocken, des Scharlachs und der Masern noch nicht; aber einmal spielen sie doch im allgemeinen nicht die Rolle der erstgenannten und andererseits hat man begründetes Recht zu der Annahme, daß sie eine besonders hohe, über die anderen Infektionserreger hinausgehende Widerstandskraft nicht besitzen“. Im Gegensatz hierzu verlangt Behring (4), „daß allgemeine Desinfektionsmittel, wenn sie die Gewähr bieten sollen, daß sie auch die noch nicht entdeckten Krankheitserreger unschädlich machen, der Anforderung entsprechen mußten, daß die bekannten Lebewesen sämtlich durch sie ihre Vitalität einbüßen“.

Zu unseren Versuchen mit einem kleinen Paket wurde der schon früher erwähnte kleine Desinfektionsapparat von Roth benutzt.

1. Versuchsreihe.

Das Paket selbst wurde in 3 Schichten eingeteilt, um das Verhalten der Sporen in verschiedener Tiefe beobachten zu können. Es umfaßte:

- 1) Die innere Schicht: 3-fach Baumwolldamast;
- 2) die mittlere Schicht: 3-fache Wollschicht;
- 3) die äußere Schicht: 4-fache Wollschicht;

so daß z. B. die Fäden der inneren Schicht in 3-fach Baumwolldamast

Tabelle III.

Kleines Paket in strömendem Wasserdampf von 98,5° mit und ohne Formaldehyd.

Bakterienart	10 Min. in Wasserdampf			30 Min. in Wasserdampf			10 Min. in Formaldehyd-wasserdampf			30 Min. in Formaldehyd-wasserdampf		
	Innere Schicht 91°*	Mittlere Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht 101°	Mittlere Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht 94°	Mittlere Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht 100°	Mittlere Schicht	Äußere Schicht
Staphyloc. p. aur.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Milzbrand—Pferd	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Milzbrand—Maus	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Subtilis 1893	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Mesent. vulg. II	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

* Temperaturangabe eines Maximalthermometers.

und 7-fach Wolle eingewickelt waren. Außerdem waren die Sporenfäden, je 4—5 an der Zahl, in sterile Filtrierpapierkapseln eingehüllt.

Die Fäden wurden vor dem Ueberimpfen in Ammoniakwasser geschwemmt.

2. Versuchsreihe.

(Mit dem kleinen Desinfektionsapparat.)

Das Paket, fester verschnürt, besteht aus:

- 1) Innere Schicht: 270 g Roßhaar, fest verschnürt.
- 2) Mittlere Schicht: 1-fach Filz und 4-fach Leinwand.
- 3) Äußere Schicht: 4-fach Wolle.

Als Testobjekte kommen Sporenfäden von Milzbrand—Maus und Subtilis 1893 zur Verwendung.

Tabelle IV.

Paket in strömendem Wasserdampf von 98,5° mit und ohne Formaldehyd.

Bakterienart	10 Min. in Wasserdampf			30 Min. in Wasserdampf			10 Min. in 0,1-proz. Formaldehyd-wasserdampf			10 Min. in 0,5-proz. Formaldehyd-wasserdampf			10 Min. in 1,0-proz. Formaldehyd-wasserdampf		
	Innere Schicht	Mittlere Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht	Mittlere Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht	Mittlere Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht	Mittlere Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht	Mittlere Schicht	Äußere Schicht
Milzbr.—Maus	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Subtilis 1893	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—

+* bedeutet stark verzögertes Wachstum.

Die Sporenfäden wurden vor dem Ueberimpfen in Ammoniakwasser geschwemmt.

3. Versuchsreihe.

Nachdem die Versuche mit kleinen Paketen eine bedeutend intensivere Desinfektionswirkung der 98,5-gradigen Formalinwasserdämpfe gegenüber dem einfach strömenden Wasserdampfe ergeben hatten, wurden dieselben mit einem voluminöseren Pakete wiederholt. Diesmal benutzte ich einen größeren Apparat von Roth (30) (50 cm Höhe und 32 cm Durchmesser, innen gemessen), der in hiesiger Augenklinik zum Sterilisieren von Verbandstoffen benutzt wird. Es wurden die gleichen Sporenfäden als Testobjekte benutzt, wie bei der 2. Versuchsreihe.

Tabelle V.

Großes Paket in strömendem Wasserdampf von 98,5° mit und ohne Formaldehyd.

Bakterienart	15 Min. in Wasserdampf				30 Min. in Wasserdampf				15 Min. in 0,1-proz. Formaldehyd-wasserdampf				10 Min. in 1-proz. Formaldehyd-wasserdampf			
	Innere Schicht	2. Schicht	3. Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht	2. Schicht	3. Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht	2. Schicht	3. Schicht	Äußere Schicht	Innere Schicht	2. Schicht	3. Schicht	Äußere Schicht
Milzbrand—Maus	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
Subtilis 1893	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—

Das Paket war in 4 Schichten eingeteilt:

- 1) Innerste Schicht: 5-fach Filz.
 - 2) 2. Schicht: 1 Woldecke (24-fache Wollschicht).
 - 3) 3. Schicht: 1 Woldecke (16-fache Wollschicht).
 - 4) Aeufferste Schicht: 1 Woldecke (8-fache Wollschicht).
- Sporenfäden vor dem Ueberimpfen in Ammoniakwasser geschwemmt.

IV.

Zu den Versuchen bei niedrigerer Temperatur wurde ein eigens zu diesem Zwecke konstruierter Apparat (Fig. 2 A) benutzt. Derselbe besteht aus starkem Zinkblech, hat Cylinderform, eine Höhe von 35 cm und einen Durchmesser von 25 cm. Um eine allzu rasche Abkühlung des Apparates zu verhüten, wurde derselbe mit einer 3-fachen Wollschicht umgeben. Der im Apparate (s. Fig. 2) sich befindende Teil des

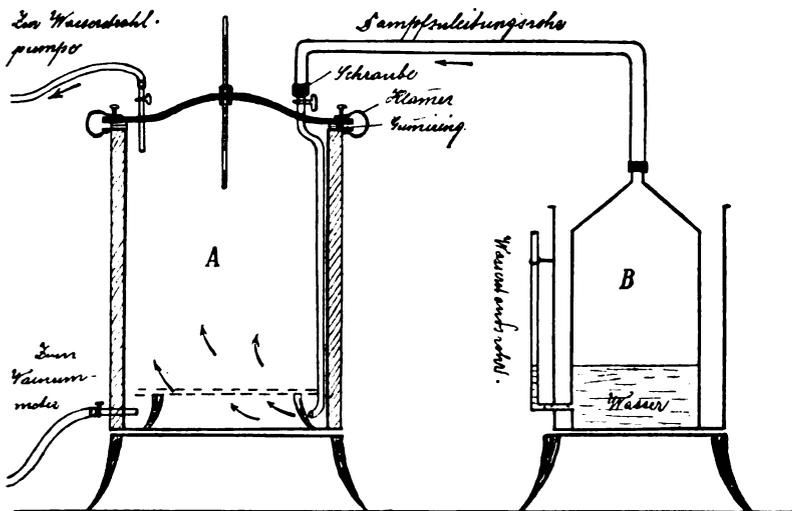


Fig. 2.

Dampfzuleitungsrohres ist an dem leicht nach oben konvexen Deckel befestigt; der über dem Hahn befindliche Teil dagegen ist abschraubbar. In der Mitte des Deckels steckt ein Thermometer. Eine kleine Abflußröhre nahe dem Boden des Apparates wurde mittels eines Gummischlauches mit einem Vakuummeter verbunden. Von der dem Zuleitungsrohr entgegengesetzten Seite des Deckels führt ein druckfester Gummischlauch zur Wasserstrahlpumpe. Behufs luftdichtem Abschluß befindet sich zwischen Deckel und oberem Rand des Cylinders ein Gummiring; der Deckel selbst wird mittels abnehmbarer Schrauben am Cylinder befestigt.

Die Temperatur im Innern des Cylinders ließ sich leicht durch Handregulierung des Bunsenbrenners ziemlich konstant erhalten. Die Versuchsanordnung war derart, daß die Formaldehydwasserdämpfe direkt aus dem kleinen Apparat Roth (Fig. 2 B) in den Blechcylinder hinübergeleitet wurden (4. Versuchsreihe); oder es wurden aus dem genannten Apparate nur Wasserdämpfe eingeleitet, während eine Formaldehydlösung im Cylinder aufgestellt war (5. Versuchsreihe); oder endlich es

wurde die Formaldehydlösung direkt im Blechcylinder A verdampft (6. Versuchsreihe).

Versuchsreihe 4a.

Um zunächst die Tiefenwirkung von Wasserdämpfen und Formaldehydwasserdämpfen zu prüfen, wurde wieder ein Paket gewählt, dessen innere und äußere Schicht Sporenfäden einschlossen. Es bestand: die innere Schicht aus 5-fach Filz und 8-fach Wolle;
 „ äußere „ „ 2 „ Wolle.

Tabelle VI.

Paket in Wasserdampf von 80° mit und ohne Formaldehyd.

Bakterienart	a		b		c		d		e		f	
	30 Min. in Wasserdampf		30 Min. in 0,5-proz. Formaldehydwasserdampf ohne Vakuum		30 Min. in 0,5-proz. Formaldehydwasserdampf 300 mm Druckdifferenz		30 Min. in 1-proz. Formaldehydwasserdampf 250 mm Druckdifferenz		60 Min. in 1-proz. Formaldehydwasserdampf 280 mm Druckdifferenz		60 Min. in 4-proz. Formaldehydwasserdampf 430 mm Druckdifferenz	
	Innere Schicht 72°	Äußere Schicht 82°	Innere Schicht 73°	Äußere Schicht 83°	Innere Schicht 76°	Äußere Schicht 78°	Innere Schicht 76°	Äußere Schicht 80°	Innere Schicht 76°	Äußere Schicht 80°	Innere Schicht 78°	Äußere Schicht 81°
Staphylococcus aureus	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Milzbrand—Maus	++	+	+	+	+	—	+	—	+	—	+	—
Subtilis 1803	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—

NB. Unter Vakuum verstehen wir hier die Differenz zwischen dem Luftdruck innerhalb und demjenigen außerhalb des Apparates, ausgedrückt in Millimetern, und welche Druckdifferenz von der Quecksilbersäule des Vakuummeters angezeigt wird.

Wir sehen, besonders aus c und f, daß die Tiefenwirkung 80-grädiger Formalinwasserdämpfe nicht eine sehr beträchtliche ist, da selbst beim Verdampfen einer 4-proz. Lösung Milzbrand—Maus in der inneren Schicht nicht abgetötet wurde.

Die Versuchsanordnung war folgende: Im Dampfentwicklungsapparat wurde mittels einer Bunsenflamme Wasser zum Sieden gebracht und bei Anwendung des Vakuums gleichzeitig die Luft aus dem Cylinder abgesogen und letzterer leicht vorgewärmt, um eine Kondensation des einströmenden Dampfes an den Wänden des Cylinders zu vermeiden. Zeigte das Vakuummeter die gewünschte Druckdifferenz, so wurde das Formalin in den Verdampfungsapparat gegossen, dann der Hahn des Dampfzuströmungsrohres ganz leicht geöffnet, so daß der Dampf langsam einströmte. Die Zeitrechnung begann mit dem Momente, da das Thermometer des Cylinders die gewünschte Temperatur anzeigte. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde das Vakuum durch weiteres Zuleiten von Formaldehydwasserdämpfen ausgeglichen und der Apparat noch 1 Stunde uneröffnet gelassen; alsdann wurden die Objekte herausgenommen und die Seidenfäden überimpft.

Versuchsreihe 4b.

Nachdem, wie aus vorhergehendem ersichtlich, die Paketversuche nicht allzu günstige Resultate ergeben hatten, wurden nun, den Verhältnissen der Praxis möglichst angepaßt, infizierte Seidenfäden in verschiedene Gegenstände gesteckt. Es kommt bei diesen letzteren Versuchen weniger auf die Durchdringung dichter Gegenstände an als vielmehr auf die Wirkung gegenüber sogenannten „toten Winkeln“. Daß letztere sehr ungünstige Verhältnisse darbieten, zeigen die Resultate, welche mit den in der Stiefelspitze untergebrachten Seidenfäden erlangt wurden. Die Versuchsanordnung ist die gleiche wie bei der Versuchsreihe 4a.

Tabelle VII.

Sporenfäden lose in verschiedenen Gegenständen untergebracht und Formaldehydwasserdämpfen ausgesetzt bei 70°.

Formaldehydwasserdampf in Proz.	Zeit in Min.	Vakuum in Millimetern	Verpackung	Bac. coli	Milzbrand—Maus	Subtilis 1893
1	30	500	Glacéhandschuh	—	—	+
—	—	—	Stiefelspitze, Schaft umgebogen	+	+	+
—	60	300	Glacéhandschuh	—	—	—
—	—	300	Stiefelspitze, Schaft umgebogen	+	+	+
—	—	300	270 g Roßhaar, verschnürt	+	+	+
—	—	—	2 Pelzstreifen, übereinander gelegt	—	+	+
2	—	360	Stiefelspitze, Schaft umgebogen	—	+	+
—	—	—	Pelzstreifen, übereinander gelegt	—	—	—
—	—	—	270 g Roßhaar	—	—	—
—	—	—	Buch, geschlossen	+	+	+
4	—	430	Schuhspitze, Schaft offen *1	—	—	—
—	—	—	Schuhspitze, Schaft umgebogen *2	—	+	+

*1 *2 Es waren in beiden Schuhen gleichzeitig Seidenfäden sterilisiert worden, welche mit Subtilis-Panophthalmie, Staphylococcus pyogenes aureus und Milzbrand—Pferd infiziert waren.

5. Versuchsreihe.

In dieser Versuchsreihe wurde nur Wasserdampf eingeleitet; eine Porzellanschale auf dem Boden des Blechcylinders B war gefüllt mit

Tabelle VIII.

Sporenfäden lose in verschiedenen Gegenständen untergebracht und Formaldehydwasserdämpfen von 70° ausgesetzt.

Vakuum in Millimeter	Verpackung	Milzbrand—Pferd	Milzbrand—Maus	Subtilis 1893
400	4-fach Wolle	+	+	+
380	Außere Rocktasche, nach unten schauend	—	—	—
—	„ „ „ oben	—	—	+
—	Brusttasche des verschnürten Rockes	—	+	+
450	Schuhspitze	—	+	+
—	Kleiderbürste	—	—	—*
—	Pelz	—	—	+

* Die in der Bürste versteckten Sporenfäden waren nicht in Filtrierpapierkapseln eingewickelt, sondern lagen frei auf dem Boden der Bürste.

400 ccm einer 10-proz. Formaldehydlösung. Aus dem Verdampfungsapparate A werden 60 Minuten lang Wasserdämpfe eingeleitet. Die Temperatur im Cylinder wird auf 70° gehalten.

Diese 5. Versuchsreihe war unternommen worden, um zu sehen, ob man nicht durch bloßes Hineinstellen einer Formaldehydlösung in einen gewöhnlichen Desinfektionsapparat mit Hilfe des Luftabsaugens befriedigende Resultate erzielen könnte. Trotz des relativ starken Vakuums ist aber der Effekt kein besonders guter, weil auf diese Art zu wenig Formaldehyd verdampft.

6. Versuchsreihe.

Die Formaldehydlösung wird direkt in dem Blechcylinder verdampft, und zwar werden zuerst das Wasser und die Objekte hineingetan, dann wird die Luft abgesogen und das Wasser im Cylinder gleichzeitig erhitzt. Sobald das Thermometer auf 70° steht, wird das Formalin in abgemessener Menge durch das Dampfzuleitungsrohr, dessen oberer Teil abgeschraubt worden, hineingegossen; die Temperatur wurde 60 Min. bei 70° gehalten.

Die Sporenfäden kamen in das gleiche Paket wie bei der 4. Versuchsreihe: Innere Schicht — 5-fach Filz und 8-fach Wolle;
äußere „ — 2-fach Wolle.

Tabelle IX.

Paket in 70-grädigem Wasserdampf mit und ohne Formaldehyd.

Vakuum	60 Min. in Wasserdampf 400 mm		30 Min. in 2-proz. Formaldehyd-wasserdämpfen 350 mm		60 Min. in 2-proz. Formaldehyd-wasserdämpfen 380 mm	
	Innere Schicht	Außere Schicht	Innere Schicht	Außere Schicht	Innere Schicht	Außere Schicht
Bakterienart						
Milzbrand—Pferd	+	—	+	—	—	—
„ — Maus	+	+	+	—	—	—
Subtilis 1893	+	+	+	—	+	—

NB. Das Maximalthermometer in der Flüssigkeit auf dem Boden des Cylinders stand jeweilen bei 90°.

Tabelle X.

Sporenfäden in verschiedenen Gegenständen untergebracht und 70-grädigen Wasserdämpfen mit und ohne Formaldehyd ausgesetzt.

Formaldehyd-wasserdampf in Prozent	Zeit in Minuten	Vakuum in Milli-meter	Verpackung	Milzbrand—Maus	Subtilis 1893
—	60	360	Rocktasche (R. verschnürt)	+	+
—	60	360	Schuhspitze	+	+
—	60	360	270 g Roßhaare	+	+
—	60	360	Pelz, zusammengelegt	—	+
1	30	380	Rocktasche	—	+
1	30	380	Schuhspitze	—	+
1	30	380	270 g Roßhaare	—	+
1	30	380	Pelz	+	+
1	60	360	Rock	—	—
1	60	360	Schuhspitze	—	—
1	60	360	270 g Roßhaare	—	—
1	60	360	Pelz	—	—

Bei den Versuchen der 5. und 6. Versuchsreihe waren die Objekte nach Ablauf der eigentlichen Desinfektionszeit noch 2 Stunden im Zylinder gelassen worden. Der Apparat kühlte sich während dieser Zeit etwas ab (die Temperatur sank meist von 70° auf 40°); das Vakuum aber blieb beinahe gleich.

Neben den eigentlichen Versuchsobjekten wurden stets noch Seidenmuster, Leder und Pelzwaren und zwar stets wieder die gleichen in den Desinfektionszylinder gelegt. Ich konnte makroskopisch weder eine Aenderung in der Farbe noch irgend sonst eine Schädigung der genannten Gegenstände nachweisen.

Fassen wir unsere Resultate zusammen, so können wir wohl sagen, daß die Tiefenwirkung der Formaldehydwasserdämpfe eine bedeutendere ist, als sie das Formaldehydgas trotz der vielen Methoden seiner Anwendung bis heute hat erreichen können.

Für die Erklärung dieser Wirkung ließe sich vielleicht folgendes geltend machen: Nach der Fliegner'schen (9) „Tabelle für gesättigten Wasserdampf“ braucht es, um Wasser zum Sieden zu bringen:

bei 45°	einen Druck von	$\frac{1}{10}$	Atmosphäre
„ 60°	„	„	„
„ 69°	„	„	„
„ 75°	„	„	„

Um also bei 69° Wasser zum Sieden zu bringen, muß der Luftdruck statt 700 nur 210 mm betragen, d. h. er braucht eine Druckdifferenz von 490 mm. Sobald wir 70-grädiges Wasser oder eine Formalinlösung unter einen Druck von 210 mm setzen, haben wir es folglich mit „strömendem Dampfe“ zu thun, welcher eben viel gleichmäßiger und viel tiefer in die Objekte eindringt, als nicht strömender.

Schlußsätze:

1) Wie aus den mitgeteilten Versuchen ersichtlich, wird die Wirkung des strömenden Wasserdampfes durch gleichzeitiges Verdampfen von Formaldehyd bedeutend gesteigert.

2) Eine besonders intensive Steigerung der desinfizierenden Kraft äußert sich in den Versuchsergebnissen mit 100 resp. 98,6-grädigem Formaldehydwasserdampf. So gingen beim Verdampfen einer 0,1-proz. Formaldehydlösung Sporen von *Bacillus mesentericus* II, welche im einfach strömenden Wasserdampfe nach 145 Min. noch lebend waren, bereits nach 10—15 Min. zu Grunde.

3) Eine so bedeutende Steigerung der Desinfektionswirkung in der Tiefe voluminöser Objekte, wie v. Es m arch sie beobachtet hat, konnten wir nicht beobachten. Der Formaldehyd scheint von den feuchten äußeren Schichten der Objekte absorbiert zu werden, so daß sich hier wässrige Formaldehydlösung ansammelt und relativ wenig Formaldehyd in die Tiefe dringt; immerhin üben schon geringe Mengen desselben eine nicht unbedeutende bakterientötende Wirkung aus.

4) Die Versuche mit Formaldehydwasserdampf von nur 70—80° ergaben sehr intensive bakterizide Wirkung gegenüber freien Sporenfäden. So gingen Sporen von Milzbrand—Maus, welche dem strömenden Wasserdampfe von 98,5° 9 Min. widerstanden hatten, in 1-proz. Formaldehydwasserdampf von 70° schon nach 4 Min. zu Grunde.

5) Die Anwendung von 70-grädigem Formaldehydwasserdampf unter Zuhilfenahme des Vakuums behufs Desinfektion der verschiedensten Objekte, hat nicht durchgehends zu befriedigenden Resultaten geführt.

Am günstigsten waren die Versuchsergebnisse, wenn die Verdampfung der Formaldehydlösung in demselben Apparate vorgenommen wurde, welche die zu desinfizierenden Objekte enthielt. Es darf dieser Unterschied in den Versuchsergebnissen wohl hervorgehoben werden, damit bei weiteren Forschungen die Frage der Art und Weise der Formalinwasserdampferwickelung Berücksichtigung findet.

6) Die eine Tatsache verdient besonders betont zu werden, wie dies schon v. Esmarch hervorhebt, daß bei richtiger Versuchsanordnung Formaldehydwasserdämpfe von 70—80° im Stande sind, auch die widerstandsfähigsten Sporen zu vernichten, d. h. bei einer Temperatur, welche für Gegenstände wie Leder, Pelz, Seidenstoffe u. s. w. nicht schädlich wirkt.

7) Eine wichtige Frage, welche der Lösung noch harret, ist die der Desinfektion großer Ballen, speziell von Roßhaarbällen; und so wäre die Einführung einer Methode, welche statt der teuren, unter erhöhtem Druck arbeitenden Desinfektionsapparate mit billigeren zu demselben Resultate kommen würde, sehr zu begrüßen.

Wir dürfen uns wohl dem Wunsche v. Esmarchs anschließen und hoffen, daß diese neue vielversprechende Methode durch weitere experimentelle Beiträge unterstützt werde, da noch viele praktische Fragen der Erledigung bedürfen und erst durch zahlreiche, mit verschiedenen Apparaten und unter verschiedenen Bedingungen ausgeführte Laboratoriumsversuche aufgeklärt werden können. Hoffen wir also, daß der Ausspruch Martins (21): „Wenn es einen Punkt gibt, über den alle Untersucher einig sind, so ist es der, daß das Formol ein Oberflächen-desinficiens ist“, bald seine Richtigkeit eingebüßt haben werde.

Am Schlusse meiner Arbeit sei es mir vergönnt, Herrn Prof. Dr. O. Wyss für die Ueberlassung des Materials des hygienischen Institutes, sowie besonders Herrn Dozent Dr. Silberschmidt für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für den allzeit gütigst gespendeten Rat meinen herzlichsten Dank auszudrücken.

Literatur.

- 1) Abba und Rondelli, Weitere behufs Desinfektion von Wohnräumen mit dem Scheringschen formogenen Apparat ausgeführte Versuche. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVIII. No. 12/13. p. 337.)
- 2) Aronson, Ueber die antiseptische Eigenschaften des Formaldehyds. (Berliner kleine Wochenschr. 1892. p. 749.)
- 3) —, Ueber eine neue Methode zur Desinfektion von größeren Räumen mittels Formalin. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXV. 1897. p. 168.)
- 4) Behring, Bekämpfung der Infektionskrankheiten. Infektion und Desinfektion. Leipzig (G. Thieme) 1894.
- 5) Bombicci, Contributo allo studio della disinfezione colla Formaldeide. (Ufficio d'Igiene di Padova Giornale della Reale Società Italiana d'Igiene. Anno 1902.)
- 6) v. Brunn, Formaldehyddesinfektion durch Verdampfung verdünnten Formalins. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXX. 1899. p. 201.)
- 7) Dunbar und Musehold, Untersuchungen über das von der Société Chimique des Usines du Rhône für Haare und Borsten empfohlene Desinfektionsverfahren mit Formaldehyd im luftverdünnten Raume. (Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XV. 1899. p. 144.)
- 8) v. Esmarch, Die Wirkung von Formalinwasserdämpfen im Desinfektionsapparate. (Hyg. Rundschau. 1902. No. 19. p. 961.)
- 9) Fliegner, „Tabelle für gesättigten Wasserdampf“. Des Ingenieurs Taschenbuch. Berlin (W. Ernst & Sohn) 1899.
- 10) Förster, Versuche über Wäschedesinfektion. (Hyg. Rundschau. Bd. XI. 1900. p. 513.)
- 11) Frank, Ueber Desinfektionswirkung des Alkohols, insbesondere der Alkoholdämpfe. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 4. p. 139.)

- 12) Verfahren zum Desinfizieren tierischer Haare des Spiritusvorlaufes. (Ref. in der Hyg. Rundschau. 1901. p. 711.)
- 13) Geppert, Ueber desinfizierende Mittel und Methoden. (Berlin. klin. Wochenschr. 1890. No. 11.)
- 14) Hammer und Feitler, Ueber elektive Wirkung des Formalins auf Milzbrandbacillen. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXIV. 1898. p. 349.)
- 15) Heider, Ueber die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel bei höheren Temperaturen. (Arch. f. Hyg. Bd. XV. 1892. p. 341.)
- 16) Hinz, Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Verwendbarkeit des Formaldehyds zur Desinfektion von Kleidungsstücken und von Wohnräumen. Inaug.-Diss. Kiel, 1900.
- 17) Kinyoun, Formaldehyd as a disinfecting agent and its practical application. (Public Health Reports. Vol. XII. 1897. No. 5. p. 89.)
- 18) Koch, R., Ueber Desinfektion. (Mitteilungen aus dem kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. I. 1881. p. 234.)
- 19) Kokubo Keisatu, Die kombinierte Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und heißer Wasserdämpfe. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXXII. 1902. No. 3. p. 234.)
- 20) Lehmann, Vorläufige Mitteilungen über die Desinfektion von Kleidern, Lederwaren, Bürsten und Büchern mit Formaldehyd. (Münch. med. Wochenschr. 1893. No. 32. p. 597.)
- 21) Martin, La désinfection pour l'aldéhyde formique gazeuse. (Rev. d'hyg. 1899. p. 613.)
- 22) Merkel, Ein Desinfektionsversuch mittels des Trillatschen Apparates und des Vakuums bei Formalinentwicklung. (Münch. med. Wochenschr. 1898. No. 46. p. 1484.)
- 23) Nocht, Ueber die Verwendung von Karbolsäuren zu desinfizierenden Zwecken. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. VII. p. 521.)
- 24) Ottolenghi, Ueber Desinfektion von tuberkulösen Sputa in Wohnräumen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIV. p. 259.)
- 25) Petruschy und Hinz, Ueber Desinfektion von Kleidungsstücken mittels strömenden Formaldehyds. (Dtsche med. Wochenschr. 1898. p. 527.)
- 26) Pottevin, Recherches sur le Pouvoir antiseptique de l'aldéhyde formique. (Annales de l'Institut Pasteur. 1894. p. 796.)
- 27) Reichenbach, Versuche über Formalindesinfektion von Eisenbahnwagen.
- 28) Reischauer, Vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit verschiedener Verfahren zur Ausführung der Wohnungsdesinfektion mit Formaldehyd. (Hyg. Rundschau. 1900. p. 577.)
- 29) Rositzky, Ueber ein einfaches, für den praktischen Arzt bestimmtes Verfahren zur Kleiderdesinfektion mittels Formaldehyds. (Münch. med. Wochenschr. 1899. p. 1372.)
- 30) Roth, Ein Desinfektionsapparat für Kleider und Verbandstoffe. (Korresp.-Blatt f. Schweizer Aerzte. 1890. p. 208.)
- 31) Schumburg, Zur Technik der Untersuchung bei der Formaldehyddesinfektion. (Deutsche med. Wochenschr. 1898. No. 52. p. 834.)
- 32) —, Ueber die Desinfektionskraft der heißen Luft. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLI. 1902. p. 167.)
- 33) Silberschmid und Bänziger, Zur Aetiologie der Panophthalmie nach Hackensplitterverletzungen. (Bericht über die 30. Versammlung der ophthalmolog. Gesellschaft, Heidelberg 1902.)
- 34) Sitsen, Ueber den Einfluß des Trocknens auf die Widerstandsfähigkeit der Mikroben Desinfektionsmitteln gegenüber. (Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVI. p. 65.)
- 35) Spengler, Tuberkelbacillenzüchtung aus Bakteriengemischen und Formaldehyddesinfektion. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLII. 1903. p. 90.)
- 36) Trillat, Sur les propriétés antiseptiques de la formaldéhyde. (Compt. rend. etc. 1892. No. 114. p. 1278.)
- 37) Walter, Zur Bedeutung des Formalins (resp. Formols) als Desinfektionsmittel. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXI. 1896. p. 421.)
- 38) —, Formaldehyd als Desinfektionsmittel. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXVI. 1897 p. 454.)

Nachdruck verboten.

A modification of the Romanowsky stain.

[From the Laboratories of Pathology and Bacteriology of the Atlanta College of physicians and surgeons.]

By **H. F. Harris, M. D.**, of Atlanta, Ga.

Since the publication by Romanowsky (1) in 1890 of his method of differential staining of the protoplasm and nucleus of the malarial parasite, many modifications of his process have been proposed with the object of simplifying the stain, and making the results more certain. Among those who have made notable advances in this direction are Ziemann (2), Nocht (3), Ruge (4), Maurer (5), Reuter (6), Michaelis (7), Leishman (8), Wright (9) and Giemsa (10). The method, as recommended by Romanowsky, was so uncertain in its results that it proved to be of but little practical value, though great credit is due to this investigator for having first discovered it. The stain was consequently not very generally employed until the matter was taken up by Ziemann, who, after a number of careful experiments, succeeded in working out a formula for its preparation that gives fairly satisfactory results. The next important step forward was the discovery of Nocht that the characteristic nuclear coloration cannot be secured by absolutely pure methylen blue, but that this effect is produced as a result of the presence in solutions of this stain of a substance that he called "red from methylen blue", and that the latter is formed as a result of the decomposition of the former, particularly when it is exposed to the prolonged action of watery alkaline solutions. This "red from methylen blue" was found by him to be present to a considerable extent in Unna's alkaline methylen blue. Michaelis showed later that the staining principle produced in these alkaline methylen blue solutions is a substance called methylen azure, and Giemsa has recently succeeded in preparing this dye in a pure state, though its cost is quite considerable. Giemsa does not recommend the employment of methylen azure alone for staining blood, but advises a mixture of it with methylen blue before adding it to the eosin solution. Maurer made a valuable contribution to this subject when he showed that by using different proportions of eosin and alkaline methylen blue the depth of the coloration secured could be controlled. He also proved that the optimum time for placing the blood films in the staining solution is at the moment when the protoplasmic and nuclear dyes are mixed. A new departure in preparing the Romanowsky stain was made by Reuter in 1901; this investigator discovered the fact that when solutions of eosin and old alkaline methylen blue are mixed, a precipitate occurs, which, when filtered out of the mixture and dissolved in alcohol, will color the parasite in a characteristic manner. Leishman, a short time after this, recommended that the stain be prepared in practically the same way, with the exception only that he dissolves the precipitate in pure methylic alcohol in place of ethylic alcohol. Wright has also recommended a stain prepared in a similar way, the only difference being that he has shown that a sufficient quantity of methylen azure may be formed from solutions of alkaline methylen blue by simply heating

in an Arnold sterilizer for an hour. In a more recent paper Reuter has accepted the modifications of Leishman and Wright.

While studying malaria during the past autumn, I prepared staining solutions after the various formulae that have been above referred to, and succeeded in a number of instances in getting most excellent results, but was early struck with the fact that all of these mixtures are in a measure uncertain, — the results obtained from specimens of blood from the same individual with the same staining fluid being at times quite different, and old blood films usually fail entirely to react in a proper manner. Perhaps the most certain and best of the modifications of this method heretofore proposed are those of Reuter, Leishman and Wright, but I find that the stain, even when prepared in this way, is not altogether certain in its action. The solution prepared according to the formula of Giemsa (the stain was procured directly from Gruebler) gives excellent results when it is freshly made, but I have found that after a short time the azure undergoes some change, and in order to secure a proper effect the proportions in which it is mixed with the eosin solution have to be changed. This is very annoying, and carries us back to the original difficulties that we encountered when working with this stain. Giemsa says that the solutions of this dye are permanent, and that we do not have to change the proportions when mixing with eosin, but whatever be the cause my experience fails to substantiate his claim, though when the stain is freshly prepared the results are faint but excellent. Another matter of some importance in connection with all of these stains is that properly color the parasites after the preparations have been made for some months, which for the purpose of class demonstration is quite annoying.

While working with these modifications of the original method it occurred to me that it might be possible that the stain could be produced by putting the preparation first in either the eosin or methylen blue, and later transferring it to the other. It seemed that if this could be done that we would be saved the annoyance of constantly mixing the solutions, and might be able to escape the uncertainty in results by which they are all more or less marred. A few experiments demonstrated that this is quite feasible, and that most excellent and powerful results could be produced when the preparations are made in this way. A 1—1000 solution of Gruebler's water soluble eosin was prepared, and another consisting of one part of Unna's alkaline methylen blue (made from Gruebler's methylen blue, med. pur.) in nine parts of water. The blood films were stained for a minute in the former solution, and from five to ten minutes in the latter. When the preparations were made in this way it was generally found that they were a trifle too blue; this difficulty may be readily removed by pouring upon the films a solution of Unna's glycerine-ether mixture made by adding one drop of this compound to 10 ccm of water, allowing it to act for a few seconds, and then washing thoroughly with distilled water. The excess of color may also be removed of Maurer suggested, by drying, and then washing a second time in water. When the blood was treated in this way it was found that it exhibits all of the effects produced by the other modifications of the Romanowsky method, with the difference only that the coloration of the nucleus is decidedly more powerful, and when the stain is allowed to act sufficiently long Maurer's "nuclear remains of the erythrocytes" are beautifully shown. It must, however,

be admitted that while a characteristic stain can be always secured by this method the intensity of the effect is rarely precisely the same in two preparations. As the result of further experimentation it was determined that when the preparations are old they should be allowed to remain in the second solution somewhat longer than the time above given, — twenty to thirty minutes being necessary in order to secure the best results. It may be mentioned that the granules in the red cells that have been attacked by the parasite of tertian fever are beautifully shown by this method — somewhat older blood films that were stained from twenty to thirty minutes giving exceptionally fine effects. At this point it may be noted that these granulations appear to be increased in size by the action of alkalies upon the more or less degenerated cells, since the longer the preparations stay in the solution — which is decidedly alkaline in reaction — the more pronounced are the granules, and if they remain in contact with the reagent sufficiently long the corpuscles containing parasites become greatly distorted, and would apparently in the course of time be entirely destroyed. After a number of experiments it was determined that the proportion of Unna's methylen blue solution, as first used, was greater than necessary, and that the addition of pure methylen blue to the stain was of advantage.

Solutions of Giemsa's "Azur I (pur.)" and his „Azur II zur Blutfärbung" were also experimented with, they having been used just as was the alkaline methylen blue after the blood was stained with the eosin; in both instances a characteristic nuclear coloration was secured, but the effect obtained from the pure azure was not so good as that gotten from the stain especially recommended for blood work. Neither of these stains act so powerfully as the alkaline solutions; they do not color the chromatin of the sexual forms except very slightly, and old blood films are scarcely stained at all.

Some attention has also been given to the different methods of fixing the blood, and while alcohol alone; or in combination with ether gives in from ten to twenty minutes excellent results, or methylic alcohol in a much shorter time, I am satisfied that the quickest and best process for clinical purposes in that of Reuter, which is to fix the blood for a few seconds in a mixture of ninety parts of alcohol and ten parts of formalin. The method of Jansc6 and Rosenberger (11) for spreading blood is for general purposes much superior to the older procedures, and particularly on account of the greater rapidity with which it may be done is to be highly recommended. As the blood is spread on slides when this method is used it is much more convenient to plunge the preparation directly in the stain than to attempt to cover them with the fluid while being held in the forceps. I have found the Coplin jar, as in all cases where staining is to be done in this way, almost indispensable. The steps in the staining of blood according to the method I have proposed is then as follows:

- 1) Spread the blood by means of the method of Jansc6 and Rosenberger.
- 2) Fix for a few seconds in Reuter's formalin alcohol mixture, and rinse with water.
- 3) Place the preparation in a 1—1000 solution of Gruebler's water-soluble eosin, and allow to remain from thirty seconds to two minutes; they may remain longer, but the blood cells are then colored

so deeply that the red nuclei of the parasites do not present a decided contrast.

4) Remove from the staining solution, and wash several times in distilled water.

5) Place in a solution consisting of 2,5—5 parts of Unna's alkaline methylen blue to which is added sufficient distilled water to make one hundred parts; 2,5 parts of a 1% solution of methylen blue may be combined with the above with advantage. The slide remains in the stain from 5—30 minutes depending upon the age of the preparation.

6) Remove from the staining solution and wash in distilled water. If the blood appear too dark, pour on it a solution of Unna's glycerine ether mixture made by adding one drop to 10 ccm of distilled water, and after this acts for a few seconds rinse off with water.

7) Dry without the application of heat.

8) Mount in acid-free balsam.

This method has the advantage that after the solutions are prepared they may be used indefinitely, that we are saved the annoyance of having to constantly mix the stains, that the proper degree of coloration can be secured in a short time, and that very old preparations may be stained. Notwithstanding the fact that when the process is carried out as above directed the nuclear staining of the parasite is very powerful all of Maurer's degrees of coloration may be obtained by regulating the stay of the preparation in the solutions depending upon the age of the films.

Bibliography.

- 1) Romanowsky, Zur Frage über den Bau der Malariaparasiten. (Wracz. 1890. p. 1171 ff.)
- 2) Ziemann, Ueber Malaria und andere Blutparasiten. 1898.
- 3) Nocht, Zur Färbung der Malariaparasiten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII.)
- 4) Ruge, Ein Beitrag zur Chromatinfärbung. (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XXXIII. 1900. p. 178.)
- 5) Maurer, Die Tüpfelung der Wirtszelle des Tertianparasiten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900.)
- 6) Reuter, Ueber den färbenden Bestandteil der Romanowsky-Nochtschen Malaria-plasmodienfärbung etc. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901.)
- 7) Michaelis, Das Methylenblau und seine Zersetzungsprodukte. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. 1901.)
- 8) Leishman, A rapid and simple method of producing Romanowsky staining in malarial and other blood films. (Brit. med. Journ. 1901. Sept. 21.)
- 9) Wright, A rapid method for the differential staining of blood films and malarial parasites. (Journ. med. research. Vol. VII. No. 1.)
- 10) Giemsa, Färbemethoden für Malariaparasiten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1902.)
- 11) Jansc6 u. Rosenberger, Arch. f. klin. Med. Bd. XXI. p. 449.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Ein-sendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Inhalt.

- | | |
|--|---|
| <p>Argutinsky, P., Zur Kenntnis des Tropicaparasiten (<i>Plasmodium praecox</i> Gr. u. Fel.), p. 144.</p> <p>Bail, Oskar u. Petterson, Alfred, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. V. u. VI., p. 167.</p> <p>Bonhoff, H., Zum Streit um den Meningococcus, p. 143.</p> <p>Catterina, G., Ueber eine bewimperte Micrococcusform, welche in einer Septikämie der Kaninchen gefunden wurde, p. 108.</p> <p>de Grandi, Silvio, Beobachtungen über die Geißeln des Tetanusbacillus, p. 97.</p> <p>Harris, H. F., A modification of the Romanowsky stain, p. 188.</p> | <p>Herrzog, Hans, Experimentelle Beiträge zur Formaldehyd-Wasserdampfdesinfektion, p. 170.</p> <p>Jensen, C. O., Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen. [Schluß.], p. 122.</p> <p>Löwit, M., Ueber Niederschlagsbildung bei der Agglutination, p. 156.</p> <p>Lucksch, Franz, Ein Beitrag zur pathologischen Anatomie des Paratyphus, p. 113.</p> <p>Silberstein, Moritz, Beobachtungen über die Entstehung von jungen Malariaparasiten aus älteren, p. 149.</p> |
|--|---|

Nachdruck verboten.

Untersuchungen und Beobachtungen über die Biologie und Pathogenität des *Bacillus prodigiosus*.

[Aus dem hygienischen Institute der kgl. Universität Turin unter Leitung des Herrn Prof. Dr. Pagliani.]

Von Dr. E. Bertarelli, Privatdozent und Assistent.

Ins Deutsche übertragen von Dozent A. Wihlfahrt, Turin.

Zahlreich sind die Nachforschungen und Studien über den *B. prodigiosus*, und es lohnte sich nicht der Mühe, noch über seine Biologie zu sprechen, wenn nicht nachstehende, dieses Thema berührende Untersuchungen wohl zu einer genaueren Kenntnis einiger für die Biologie dieses Keimes interessanter Tatsachen führten.

Um Weitläufigkeiten zu vermeiden und nicht oft Erwähntes zu wiederholen, erspare ich mir die Geschichte des *B. prodigiosus*. Scheurlen hat schon seit dem Jahre 1896 einen guten Teil der Notizen, die wir über diesen Keim besitzen, im Auszuge zusammengestellt und dabei auch, und zwar in vorzüglicher Weise, des geschichtlich bekannten, sozusagen epidemischen Auftretens des *B. prodigiosus* gedacht.

Anstatt die zahlreichen, den *B. prodigiosus* behandelnden Arbeiten hier aufzuführen, dessen Bibliographie ich ans Ende dieser Studie verlegt habe, dürfte es wohl genügen, hier in großen Zügen aller jener Erwähnung zu tun, die sich mit ihm *ex professo* abgaben, und alle jene Arbeiten zu übergehen, in denen dieser Keim nur beiläufig — speziell bei Gelegenheit systematischer Nachsuchungen über Desinfektionsmittel — hinsichtlich seiner Resistenz und Aktivität erwähnt wird.

Nach Ehrenbergs Entdeckung des *B. prodigiosus* im Jahre 1839 (was nicht ausschließt, daß der Venezianer Bartolomeo Bizio seiner schon 1819 Erwähnung tat) beschrieb ihn dann Cohn als *Micrococcus*. Schottelius studierte ihn neuerdings und analysierte als Erster die Pigmentsubstanz desselben. Später kehrte Kuntze zu diesem Argumente zurück, bezüglich dessen dann auch Kübler und Rosenberg, Schröter, H. Marx, Schlüter, Schneider, Müller, Kowalewski, Spica, Kraft u. a. wertvolle Publikationen machten.

Der größte Teil dieser Autoren beschäftigte sich hauptsächlich mit der Morphologie des *B. prodigiosus*, der Natur seines Pigmentes und den Umständen, die die Pigmentation modifizieren konnten.

So behandelt Schneider in seiner Studie chemische Differential-eigenschaften des *Prodigiosus*-Pigmentes; Schottelius zeigt uns, unter welchen Umständen und durch welche Einwirkungen sich das Pigment verändert und wie leicht es ist, pigmentlose Kulturen zu erhalten, die nicht einmal nach Uebertragung auf Kartoffeln ihre charakteristische Farbe zurückerhalten.

Kuntze dagegen interessierte sich besonders für das Studium des Einflusses der verschiedenen dem Kulturboden beigefügten Salze und die damit zusammenhängenden pigmentarischen und morphologischen

Veränderungen dieses Keimes. Auch Kübler trat einigen Problemen der Morphologie des *B. prodigiosus* näher, besonders seiner Entwicklung unter besonderen Verhältnissen, während Rosenberg die verschiedenen Eigenschaften und die Natur der farbigen Substanzen eingehend behandelte, ein Argument, bezüglich dessen Spica und neuerdings Kraft interessante Beiträge veröffentlichten, letzterer besonders behandelte in seiner Doktoratsthese fast alle Punkte der chemischen Konstitution des Pigmentes. Analoge Nachforschungen hat Schlüter angestellt über die Entwicklung in sauren und Alkaliböden, während Wasserzug mit seinen interessanten Studien Aufklärung zu bringen suchte über die morphologischen Modifikationen, die dieser Keim bei Züchtung auf antiseptische Mittel enthaltendem Boden aufweist. Scheurlen trat in seiner vorgenannten Arbeit der Mobilität und den Geißeln des *Prodigiosus* näher. F. Müller studierte die reduzierende Kraft dieser Bakterien; Gorini konzentrierte seine Nachforschungen auf das koagulierende Ferment derselben. Kowalewski rückte den Stoffwechselprodukten näher, während H. Marx und Woithe ihre Aufmerksamkeit einigen morphologischen Besonderheiten zuwandten, die sich vor allem auf die Anwesenheit der Babes-Ernst-Körperchen in dem *Prodigiosus* bezogen.

Hier sei es mir gestattet, einige weniger interessierende Arbeiten zu übergehen, wie z. B. die Fermis über die peptonisierende Kraft der Keime, die von Wolfenden und Rost, Galeotti u. a. über die Einwirkung des Lichtes auf das Pigment des *Prodigiosus*, und jene Stagnitta-Balistreris über die Formation von Schwefelwasserstoff etc.

Weniger zahlreich sind die Forschungen, die die pathogene und toxische Aktion des *B. prodigiosus* ins Auge fassen.

In einer systematischen Studie über die Ursachen der Eiterung haben zuerst Grawitz und de Bary beobachtet, daß die subkutane Inokulation von Hunden, Ratten und Kaninchen mit *Prodigiosus*-Kulturen nach Verlauf von 3—6 Tagen an der Inokulationsstelle Absceßbildung bewirkte. Zu demselben Resultate gelangten sie nach Inokulation getöteter *Prodigiosus*-Kulturen und Terpentin.

Die Beobachtung Grawitz' und de Barys führte sogar zu den Versuchen, den *B. prodigiosus* zur Heilung des Carcinoms zu verwenden. W. B. Colles und Friedrich haben zu diesem Zwecke in die nicht operierbaren Carcinommassen *Prodigiosus*-Kulturen inokuliert, um in der vom Neoplasma betroffenen Gewebezone eine kräftige Eiterung hervorzurufen. Die Erfolge waren indes wenig ermutigend und es wurden daher die Versuche nicht wiederholt.

J. Steinhaus hat die Nachforschungen über die Eiterungsfähigkeit des *Prodigiosus* kontrolliert und dabei beobachtet, daß die in Hund und Katze inokulierten lebenden oder toten Kulturen dieses Keimes Abscesse ergeben, während die Eiterung im Kaninchen nur schwer zu stande kommt.

Nach den Arbeiten von Grawitz und de Bary verdienen hier die zahlreichen Untersuchungen Rogers und anderer Franzosen in Erinnerung gebracht zu werden über die Einwirkung des *B. prodigiosus* und die dementsprechende Verstärkung der pathogenen Eigenschaften geschwächter oder an und für sich inoffensiver Keime.

Roger inokulierte dem Kaninchen subkutan 1—2 ccm *Prodigiosus*-Kultur und bemerkte dabei nur das Entstehen lokaler

Erscheinungen; darauf injizierte er mit dem *Prodigiosus* einige Tropfen gangränöser Serosität (septischer *Vibrio*?) und erzielte den Tod des Tieres in weniger als 24 Stunden. Niemals fand er aber im Blute den *Prodigiosus*; er schloß daraus, daß dieser Keim ein Gift bildet, das ein der Entwicklung des septischen *Vibrio* günstiges Terrain erzeugt. Mit den in Alkohol unlöslichen, in geeigneter Weise separierten und dem Kaninchen zusammen mit dem gangränösen Serum injizierten *Prodigiosus*-Substanzen beobachtete er analog eine immediate Steigerung des septischen *Vibrio*.

Roger kam mehrmals auf dieses Argument zurück und beschrieb in einigen Arbeiten verschiedene für die Biologie des *B. prodigiosus* und die Kenntnis von den mikrobischen Assoziationen äußerst interessante Vorgänge. So bemerkte er z. B., daß die Inokulation von 4—5 Tropfen *Prodigiosus* in die Blutbahn des Kaninchens höchstens Schläfrigkeit, Anorexie und transitorische Hyperthermie erzeugte. Injizierte er kleine Quantitäten *Prodigiosus* und hämatischen Milzbrandbacillus, so gelang es ihm, die Wirkung des Milzbrandbacillus zu reduzieren, so daß also die mit reinem Milzbrandbacillus geimpften früher starben als jene Tiere, denen *B. prodigiosus* mit Milzbrandbacillus inokuliert worden war. Bei den Meerschweinchen zeigte sich ein entgegengesetztes Phänomen.

Mit kleinen Dosen soll es diesem Autor überdies gelungen sein, die Virulenz des *Streptococcus* zu steigern, ohne mehr als die löslichen Produkte der Bakterien dazu zu verwenden.

Vaillard und Vincent hatten bezüglich des Tetanus identische Resultate und Besson bezüglich des septischen *Vibrio*, alles Ergebnisse, die schon von Monti in Italien für andere Keime und andere mikrobische Assoziationen erhalten worden waren.

Nocard ging auf der Basis der Rogerschen Beobachtungen weiter und wies darauf hin, daß die Substanz, welche im *Prodigiosus* ganz besonders die Eigenschaft besitzt, die Virulenz des symptomatischen Milzbrandbacillus zu steigern, das Trimethylamin sei.

In Italien versuchte es C. Massa mittels des *B. prodigiosus* Saprophyten zu verstärken und veröffentlichte dann, daß es ihm mit Inokulation von an und für sich unschädlichen Mischungen von *B. prodigiosus* und *violaceus* gelungen sei, die Tiere durch eine Mischung von *Prodigiosus* und *Violaceus* zu töten. Ein ziemlich zweifelhaftes Resultat und derart, daß Baumgarten, als er diese Arbeiten in seinem Jahresberichte vorbrachte, es für nötig hielt, eine besondere Notiz beizufügen, die besagte, daß die Resultate mit Reserve aufgenommen werden müssen, nicht zum mindesten wegen der Unzulänglichkeit der Kontrollversuche.

Neuerdings hat H. Marx das Studium der Pathogenität des *Prodigiosus* von neuen Gesichtspunkten an wieder aufgenommen, und es ist ihm auch wirklich nach Inokulation von *B. prodigiosus* und *B. oedematis maligni* gelungen, im Frosche den *Prodigiosus* virulent zu machen, in einer Weise, daß er für weiße Mäuse pathogen wurde. Es verlor jedoch der *Prodigiosus* sein Pigment, so daß dann bei den mit den Mäusen vorgenommenen Isolierungen eine der hauptsächlichsten Differentialeigenschaften des Keimes fehlte. Eben deshalb weist Czaplewski, der die Arbeit in Baumgartens Jahresbericht besprochen hat, darauf hin, daß diese Beobachtungen mit Reserve aufzunehmen seien.

Aus alledem erhellt schließlich, daß nach Ansicht fast aller Autoren (sowohl bezüglich lebender wie toter Kulturen) der *B. prodigiosus* für die Versuchstiere nicht pathogen ist. Nur einige der Autoren halten dafür, daß der *Bacillus* im stande ist, Eiterungsvorgänge zu bewirken, die besonders von dem bakterischen Protein erzeugt werden, welch letzteres ein bemerkenswertes chemotaktisches Vermögen haben soll. Demgemäß finden wir in vielen Lehrbüchern und Wörterbüchern der Bakteriologie nichts über eine mögliche toxische oder septikämische Wirkung des *B. prodigiosus*, sei es auch nur experimentell und nicht spontan.

Einige Handbücher besagen sogar ohne weiteres, daß der *Prodigiosus* geradezu inaktiv ist (Miquel, Cambier, Abba, Lustig, Eisenberg, Migula etc.), einige andere, Flügge, Lehmann-Neumann, glauben, daß der *B. prodigiosus* als solcher inaktiv ist, dagegen die Pathogenität anderer Keime verstärken kann. Wenige Lehrbücher nur (Günther, Fraenkel) erwähnen, daß große Dosen dieses Keimes bei subkutaner Inokulation eine Lokalentzündung mit nachfolgender Suppuration und gleichzeitigen allgemeinen transitorischen Erscheinungen hervorrufen können. Deshalb pflegt man also im allgemeinen der Anschauung zu huldigen, daß der *Prodigiosus* entweder absolut inoffensiv oder höchstens für die Versuchstiere schwach toxisch ist.

Vorliegende Untersuchungen verdanken ihren Ursprung dem Zufalle. Im Begriffe, den *Meningococcus Weichselbaums*, der in Turin von *Vanzetti* isoliert worden ist, virulent zu machen, hatte ich diesen Kokken mit den verschiedensten pathogenen Keimen und Saprophyten in Meer-schweinchen und Kaninchen verimpft, ohne wirklich positive Resultate zu erhalten. Zwei der mit starken Dosen (2 ccm Mischung zu gleichen Teilen Bouillonkultur von *Meningococcus* und *Prodigiosus*) auf intravenösem Wege geimpften Kaninchen erlagen nach 24 Stunden. Der mikroskopische Befund legte klar, daß der Tod infolge toxischer Septikämie eingetreten war. Das parietale und viscerales Peritoneum war hyperämisch, ebenso die Nebennieren, die Milz dagegen etwas angeschwollen und tiefrot gefärbt, sowie etwas weicher als gewöhnlich. Die mit diesem Organ angestellten Versuche ergaben die Gegenwart zahlreicher nach Gram sich färbender Kokken. Die Kulturen der Milz, des Blutes und der anderen Organe sprachen für die Gegenwart einer großen Quantität von Bacillen, die sowohl morphologisch wie auch hinsichtlich ihres Verhaltens dem Gramschen Verfahren gegenüber an den inokulierten *Prodigiosus* erinnerten. Angesichts eines solchen Autors und Lehrbüchern zuwiderlaufenden Befundes habe ich versucht, den *B. prodigiosus* den verschiedensten Tieren auf verschiedenen Wegen einzuimpfen.

Zu diesen Proben habe ich sowohl Laboratoriums-*Prodigiosus*, der vor einigen Jahren aus dem Trinkwasser Turins isoliert worden war (kurze Zeit, nachdem beträchtliche Massen *Prodigiosus* zwecks Prüfung der Filterkraft dieser Terrains über die Zone ausgegossen worden waren, in der sich das betreffende Wasser ansammelte), wie auch solchen aus den Laboratorien des Dr. Král, Prof. Foà und Prof. Sormani verwandt.

Die 4 Sorten des *Prodigiosus* zeigten nun ein sehr ähnliches Verhalten, waren aber von verschiedener Intensität. Die im Labo-

ratorium konservierte Sorte hat sich am aktivsten erwiesen und es wurden also die nachstehend beschriebenen Untersuchungen hauptsächlich mit ihr ausgeführt. Ich halte es für überflüssig, hier noch besonders zu bemerken, daß hierbei die morphologischen und kulturellen Kennzeichen der angewandten Keime genau kontrolliert wurden und genau denen entsprachen, die in allen Atlanten und Lehrbüchern dem *Prodigiosus* zugeschrieben werden.

Wirkung des *Prodigiosus* in den Tieren: Der *B. prodigiosus* hat bei Laboratoriumstieren diskrete pathogene Kraft.

Die Einimpfung von Bouillonkulturen oder wässrigen Agarkulturemulsionen auf intraperitonealem Wege führt beim Meerschweinchen nach kürzester Zeit den Tod herbei, sobald man sich nur einer stärkeren Dosis bedient. Von wenig aktiven Kulturen sind höchstens 2 ccm erforderlich; von stärkeren genügen 0,8—1 ccm. So töteten die im Laboratorium vorhandenen Kulturen das Meerschweinchen in 18—36 Stunden.

Die subkutane Inokulation ist beim Meerschweinchen weniger wirkungsvoll; doch gelingt es zuweilen, das Tier bei Verwendung von 2—2,5 ccm zu töten. Einige Stämme des *Prodigiosus* aber bewirken auf diesem Wege niemals den Tod des Tieres.

Die intravenöse Injizierung ist beim Tiere bei einer Dosis von 1—1,5 ccm Bouillonkultur nach 12—24 Stunden tödlich.

Der Tierbefund ist konstant: Akute Entzündung des ganzen Peritoneums, dürftiges seröses Exsudat, Ausdehnung der Intestinalkrümmungen, hyperämische Nieren und Nebennieren, zuweilen mit hämorrhagischen Flecken, normale oder wenig vergrößerte Milz, lebhaft gefärbung mit rotbraunen hämorrhagischen Flecken. An den Lungen und an der Leber nichts Bemerkenswertes.

Der Befund kommt also im großen und ganzen einer schweren akuten Vergiftung gleich. Die mikroskopische Untersuchung der Milz ergibt im ganzen Organ zerstreute Kokken. Dieselben Bakterienformen, wenn auch in geringerer Anzahl, so doch immer noch in bedeutenden Quantitäten, finden sich im Blute. Auch in der Leber sind besagte Keime, ebenso in den Nieren (doch in geringerer Anzahl) und im Eierstock. In allen diesen Organen begegnen wir jedoch keinen beachtenswerten Läsionen, abgesehen von Hyperämie und eventuellen hämorrhagischen Infarkten. In ganz seltenen Fällen, bei denen der Tod 36 Stunden nach erfolgter Inokulation eintritt, wird makroskopisch und mikroskopisch eine beginnende Fettdegeneration der Leber sichtbar.

Die Kulturenprüfung ergab ebenfalls die Gegenwart zahlreicher Bacillen in der Blutbahn, Bacillen, denen wir stets an den Extremitäten der Blutwege begegnen und die in den isolierten Kulturen zahlreiche und typische *Prodigiosus*-Kulturen zu stande bringen.

Die Mikroorganismen können auch über die Placenta hinausgehen; so findet man bei tragenden Meerschweinchen nach *Prodigiosus*-Inokulationen zahlreiche Bacillen in den Organen des Fötus.

Das Bemerkenswerteste bei diesen Kulturen ist, daß sie fast immer rot erscheinen (zuweilen rosa, feuerrot und auch selbst fuchsinrot), auch dann, wenn sie bei 37° auf alkalischem Agar gezüchtet wurden. Dieses sich fast konstant darbietende Phänomen wird noch augenscheinlicher, wenn man die Kulturen zuerst 24 Stunden lang auf 37° hält (während welcher Zeit sie bereits eine deutlich rote Färbung aufweisen) und sie dann auf 25° bringt. Ueberdies erwerben die seit geraumer Zeit pigment-

losen Laboratoriumskulturen, die sich, selbst auf Kartoffeln gezüchtet, sehr schlecht pigmentieren, mit der Tierpassage das Vermögen, die chromogene Substanz stark zurückzubilden. Dieser Vorgang ist nicht nur deshalb interessant, weil er nicht nur ein kleines biologisches Problem löst, um dessen Lösung sich Schottelius resultatlos bemüht hat (da die seit langer Zeit pigmentlosen *Prodigiosus*-Massen auf keinem Wege Pigment erwerben, auch nicht bei Züchtung auf Kartoffeln und den verschiedensten Böden), sondern auch, weil es dem entspricht, was Gessard ganz kürzlich betreffs des *Pyocyaneus* beobachtete. Dieser Verfasser hat in der Tat wahrgenommen, daß der *B. pyocyaneus* unter gewissen Umständen des parasitären Lebens im lebenden Organismus die Eigenschaft erwerben kann, ein fluorescences und ein rotbraunes Pigment zu erzeugen.

Die Serieninokulation erhöht beim Meerschweinchen die Pathogenität des *Prodigiosus* nur unbedeutend. Niemals jedoch gelingt es, den Tod des Tieres mit Dosen von weniger als 0,5—0,5 ccm herbeizuführen, selbst wenn die Kulturen 12 Tage alt sind.

In dieser Hinsicht möchte ich auf die große Wirksamkeit hinweisen, die die alten Kulturen im Vergleiche zu den neuen haben. Es kommt dies vor allem daher, daß die den Tod der Versuchstiere veranlassenden Erscheinungen zum größten Teile toxische sind und die Toxizität mit dem Alter der Kulturen wächst.

Ist die inokulierte Dosis nicht tödlich, so kann man den *B. prodigiosus* auch nach 3—4 Tagen in der Blutbahn der geopferten Tiere vorfinden; selten nur kann man Bakterien enthaltende Phagocyten antreffen.

Nach subkutaner Inokulation zeigt sich dagegen fast immer eine Lokalreaktion (wenn die inokulierte Dosis nicht tödlich ist), die durch ein wenig reichliches purulentes Exsudat charakterisiert ist. Nur in äußerst seltenen Fällen kommt es zu einer Absceßbildung, wie solche Grawitz und de Bary beschreiben.

Das Kaninchen ist weniger empfänglich als das Meerschweinchen, doch tritt auch bei ersteren nach Injizierungen mit 2—2,5 ccm 8—12 Tage alter Bouillonkultur leicht der Tod ein, wobei der Befund wie gewöhnlich auf Toxikämie und dazu noch auf Gegenwart von Keimen in Milz und Blut lauten wird. Zu demselben Resultate gelangt man mit Inokulation geringerer Dosen in die Blutbahn.

Die Ratte (*Decumanus albinus*) ist ebenfalls dem *Prodigiosus* gegenüber sehr empfindlich, was in einem gewissen Widerspruche steht mit ihrem sonstigen Verhalten gegenüber anderen Keimen, die für andere Tiere weit pathogener sind. Eine Peritonealinokulation von 0,2—0,3 und zuweilen auch 0,1 ccm Bouillonkultur tötet das Tier in weniger als 24 Stunden mit Erscheinungen und Befund wie beim Meerschweinchen. Auch die subkutane Injizierung einer Dosis von 0,3—0,4 ccm wirkt fast sofort tödlich.

Noch empfindlicher ist die kleine Maus (*Musculus albinus*), die stets schon bei subkutaner Einimpfung von 0,1 ccm 6 Tage alter Bouillonkultur erliegt.

Die Kennzeichen der aus der Milz, den anderen Organen und dem Blute der durch *Prodigiosus* verendeten Tiere erhaltenen Kulturen sind fast konstant, womit also gesagt ist, daß nicht allein pigmentlose Stämme des *B. prodigiosus* sofort das Pigment zurückerkwerben, sondern sich sehr oft auch bei 37° pigmentiert zu erhalten vermögen.

Mit der Zeit und nach zahlreichen Durchgängen habe ich schließlich einen *Prodigiosus* erhalten, der auf 37-gradigem Agar während 2 oder 3 Kulturpassagen rot wuchs, während er ziemlich blaßrosa blieb, wenn man ihn in der gewöhnlichen Zimmertemperatur züchtete.

Isoliert man dann den *Prodigiosus* aus den Organen der nach Injektionen mit diesem Keime erlegenen Tiere, so zeigt er etwas veränderte Form und sieht wie ein echter plumper *Bacillus* aus, aber bedeutend weniger kokkenförmig als in den gewöhnlichen Kulturen.

Fassen wir also alles zusammen, so kommen wir zu folgendem Resultat: Der *Prodigiosus* kann in einigen Tieren (besonders im Meerschweinchen, in der Ratte und der Maus) eine tödliche toxische Septikämie erzeugen, sobald er in mittelstarken Dosen inokuliert wird. Der Befund so behandelte Tiere ist der einer überwiegenden Intoxikation, doch beobachtet man unterm Mikroskop und vermittelst der Kulturen eine unzweifelhafte Gegenwart und Vermehrung des *B. prodigiosus* im Blute und den Organen.

Uebers dies erhält der *Prodigiosus* nach Durchgängen durch das Tier, falls er pigmentlos, das Pigment zurück und das auch, wenn es nicht gelingt, ihm das nach Kartoffelkulturen charakteristische Pigment wiederzugeben. Ist er pigmentiert, so kann er das Pigment verstärken, und sich auch häufig bei 37° C pigmentiert erhalten.

Handelt es sich nun wirklich um eine Form von sekundärer Septikämie oder um akute Intoxikation, oder wird etwa die Gegenwart von Bacillen in der Blutbahn und der Milz nicht von einer agonischen oder postmortalen Invasion inokulierter Keime bedingt, einer Invasion, die durch eine akute Intoxikation ermöglicht wird, die ihrerseits wieder den bakteriischen Proteinen oder den inokulierten löslichen Produkten ihre Entstehung verdankt?

Die Tatsache, mit subkutanen Injektionen einen gleichen Befund erhalten zu haben, würde nun wirklich innerhalb gewisser Grenzen die Möglichkeit ausschließen, daß es sich um eine zufällige Gegenwart der inokulierten Keime handelt. Uebers dies wiesen die auf peritonealem Wege mit 1 ccm Bouillonkultur geimpften und 6 Stunden nach der Injektion getöteten Tiere schon große Quantitäten *B. prodigiosus* in der Milz auf.

Um aber darzutun, daß das Vorhandensein der Bacillen in der Blutbahn nicht nur keine passive Erscheinung ist, sondern im Gegenteil einer gewissen Bedeutung nicht entbehrt (bedeutungsvoll, wenngleich sekundär nach Intoxikation), kann man noch andere überzeugende Beweise heranziehen.

Vor allem fällt es nicht schwer, zuzugeben, daß die Keime in der Blutbahn des noch lebenden Tieres außerordentlich vervielfältigt sind. Zu diesem Zwecke habe ich aus dem inokulierten Material isolierte Präparate hergestellt und die Zahl der Keime und approximativ auch die der inokulierten Bacillen berechnet. Ebenso wurde mit einer aus Blut- und Milzsaft bereiteten Normallösung verfahren und dann zu isolierenden Kulturen geschritten. Nimmt man auch hier eine approximative Berechnung der angetroffenen Keime vor, so ergibt sich, daß das Ver-

hältnis zwischen inokulierten und vorgefundenen Keimen mindestens 1:100 ist. So ist es alsdann möglich, die toxische von der septikämischen Wirkung zu trennen. Zu diesem Zwecke habe ich die Toxizität der filtrierten Bouillonkulturen, der durch die Wärme getöteten Bouillon- und Agarkulturen geprüft.

Die mit der Kerze filtrierten *Prodigiosus*-Bouillonkulturen sind nicht sehr giftig, was schon daraus hervorgeht, daß das Meerschweinchen 4—8—10 und 20 Tage alte filtrierte Bouillonkulturen in Dosen von 5—8 und oft auch von 10 ccm folgenlos verträgt.

Die durch Hitze getöteten Bouillonkulturen (der *Prodigiosus* ist sehr widerstandsfähig, seine, nach zahlreichen Seriendurchgängen erhaltenen Kulturen widerstehen noch 1 Stunde lang bei selbst 80°) haben eine schon ausgeprägtere toxische Wirkung. Mit 6—8-tägigen Kulturen tötet man aber ein Meerschweinchen nur nach Dosen, die den doppelten und 3-fachen der lebenden Kulturen entsprechen; mit 15—20-tägigen Kulturen erhält man dasselbe Resultat auch mit solchen, die nur wenig unter dem Doppelten der lebenden Kultur stehen. Doch tritt der Tod in keinem Falle so rasch ein wie nach Verwendung lebender Kulturen. Um diese Tatsachen nun besser zu beleuchten, trachtete ich danach, die pathogenen Eigenschaften des *Prodigiosus* für einige Tiere, besonders für das Meerschweinchen, zu verstärken.

Die Serienpassagen steigerten nun aber den Keim nur sehr wenig, und niemals gelingt es, Kulturen (nicht mehr als 48-stündige) zu erhalten, die unter 0,8—0,9 ccm tödlich sind. In diesem Falle jedoch zeigen die 10—12-tägigen Kulturen eine größere Toxizität, derart, daß man mit ihnen Meerschweinchen auch mit 0,5 ccm lebender Kultur töten kann.

Die Passagen durch verschiedenartige Tiere, wie Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen, geben auch kein besseres Resultat, ebenso bleibt die Assoziation des *Prodigiosus* mit Keimen, die sich anderen Tieren gegenüber ohne Beimischung inaktiv erweisen (*Proteus*, *Meningococcus intracellularis*, *Staphylococcus aureus* [abgeschwächt], *Cholera vibrio* etc.) wenig erfolgreich.

Bessere Resultate habe ich erzielt mit Passagen im Peritoneum mittels Celloidinsäckchen. Nach 6 Durchgängen erhielt ich einen *Prodigiosus*, dessen 24-stündige Kultur (erhalten durch Einsäung des Produktes des letzten Seriensäckchens in Bouillon) ein Meerschweinchen bei einer Dosis von 0,4 ccm in 24 Stunden tötete. Dieselbe 24-stündige Bouillonkultur, einmal bei 80° getötet, bewirkte erst bei einer Dosis von 0,3 ccm letalen Ausgang, während hingegen dieselbe 36-stündige Kultur, mit der Kerze filtriert, auch dann inaktiv war, wenn sie in starken Dosen — 8 ccm — ins Peritoneum des Meerschweinchens injiziert wurde.

Mit anderen Worten, es war gelungen, mit dieser 24-stündigen Kultur die septikämische Kraft zu verstärken, während das toxische Vermögen eher schwach blieb.

Diese Steigerung ist also bei den Celloidinsäckdurchgängen fast konstant, wenn sie auch nicht immer einen so hohen Wert erreicht.

Giftige Produkte des *Prodigiosus*. Nach alledem ist es also unzweifelhaft, daß die hauptsächlichste Einwirkung des *Prodigiosus* auf die Versuchstiere die toxische ist. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird das mit lebenden Kulturen inokulierte Tier rasch vergiftet und gestattet eine rasche und reiche Entwicklung des Keimes, der so die

toxische Substanz vermehrt und den Tod herbeiführt. Es ging also der Tod in Wirklichkeit immer von einer Toxikämie aus, bei Gegenwart von zahlreich vermehrten Keimen in der Blutbahn, die dann auch noch ihrerseits, durch Verstärkung der Toxikämie, schaden.

Eine solche Tatsache, die nun freilich nicht ganz mit dem übereinstimmt, was nach Radziewski bei dem größten Teile der Infektionen geschieht, würde es erklären, warum trotz weitgehender Verbreitung des Prodigiosus in der Natur und seiner bedeutenden Resistenz niemals weder beim Menschen noch beim Tiere spontane Prodigiosus-Infektionen beobachtet wurden, nämlich, weil eben die Inokulation starker Keimquantitäten erforderlich ist, um eine beachtenswerte Einwirkung zu erzielen.

Auf jeden Fall geht daraus hervor, daß der Prodigiosus eine wirklich sehr bedeutende toxische Kraft besitzt und in dem vergifteten Organismus eine rapide Multiplikation im Kreislaufe bewirken kann. Es tritt dies auch effektiv mit einer solchen Beharrlichkeit ein, daß ich mich beim Unterrichte zur Darlegung einer Septikämie im Laboratorium (besonders aber zur einfachen Demonstration der im Kreislauf und der Milz befindlichen Keime) stets des Prodigiosus bediene, der, wenigstens von diesem Gesichtspunkte aus, bessere und konstantere Resultate abgibt als andere Keime mit größerer pathogener Kraft.

Aus einigen der vorerwähnten Untersuchungen (Roger, Vaillard etc.) erhellte, daß die vom Prodigiosus gebildeten löslichen Substanzen die Eigenschaft besaßen, die Virulenz sonst wenig wirkungsvoller Keime zu verstärken und dies in derselben Weise wie der Prodigiosus. Meine Versuche führten mich jedoch zu anderen Resultaten. Ich hielt es daher für angebracht, einige der vom Prodigiosus gebildeten oder in ihm enthaltenen toxischen Substanzen genau zu untersuchen, um zu erfahren, welchen von beiden die bei den Versuchstieren beobachtete rapide Intoxikation zuzuschreiben ist.

Lösbare Produkte: Mit der Kerze filtrierte Prodigiosus-Bouillonkulturen verschiedenen Alters besitzen ein schwaches toxisches Vermögen.

Zum Beweise dieser Tatsache nachstehend einige Daten aus dem Laboratoriumsprotokoll:

Mai 1902. Filtrierte 10-tägige Bouillonkulturen.

	Gewicht in g	Injektion	ccm	Resultat
Meerschweinchen	300	Bauchhöhle	4	lebend nach 10 Tagen
"	320	"	7	lebend
"	310	"	6	do.
"	300	"	8	stirbt in 24 Stunden
"	320	"	10	do.
"	350	"	8	lebend
"	320	"	6	stirbt in 36 Stunden

Im allgemeinen gelingt es, selbst mit 10—12—15-tägigen ins Peritoneum injizierten Bouillonkulturen in Dosen unter 6 ccm nicht das Meerschweinchen zu töten. 2—3-tägige Bouillonkulturen sind fast absolut kraftlos, auch wenn sie aus mit verstärktem Material präparierten Kulturen erhalten wurden, die den in der Bauchhöhle des Meerschweinchens gehaltenen Celloidinsäckchen entstammten. Das alte Bouillonkulturenfiltrat ist bei weitem wirksamer. Zweifellos ist es sicher, daß eine direkte Beziehung existiert zwischen Alter und Wirksamkeit des Filtrats.

Diese filtrierten Bouillonkulturen enthalten nun auch chemotaktische Substanzen, dergestalt, daß man nach Bauchhöhleninjektionen das Auftreten eines dürrüfigen, ziemlich leukocytenreichen Exsudats wahrzunehmen vermag und außerdem eine diskrete Quantität hämolytischer Substanzen. Diese Tatsache ist schon von Pasquini in einigen seiner Studien über die hämolytische Kraft der Kulturfiltrate verschiedenster Keime festgestellt worden.

Die hämolytische Wirkung habe ich an den roten Blutkörperchen des Meerschweinchens und des Kaninchens sowohl nach der Methode Londons wie auch mit der direkten Probe an nicht gewaschenen Erythrocyten untersucht, mit dem Ergebnisse, daß die hämolytische Wirkung der *Prodigosus*-Bouillonkulturen bezüglich der Erythrocyten des Meerschweinchens sehr stark ist, dagegen hinsichtlich der des Kaninchens fast nicht existiert. Das erhaltene Hämolyse weist eine den toxischen Bakterien sehr ähnliche Beschaffenheit auf.

Bringt man das Filtrat bei 0° in Berührung mit den roten Blutkörperchen des Meerschweinchens und überträgt man dann von neuem die Erythrocyten in eine Lösung von NaCl von 0,85 Proz. bei 37°, so emulsionieren sich die Erythrocyten, d. h. es existierte in dem Hämolyse eine haptophore Gruppe, die im stande ist, sich bei niedriger Temperatur auf den Erythrocyten zu fixieren.

Bakterienproteine: Die durch Hitze getöteten und von den löslichen Produkten mittels wiederholter Filtration und Waschungen mit physiologischen Lösungen getrennten Bakterienkörper erweisen sich Tieren gegenüber bedeutend wirksamer als die löslichen Produkte. Mit 1 mg dieser bakterischen Kadaver kann man den Tod des Meerschweinchens in weniger als 36 Stunden nach vollendeter peritonealer Inokulation herbeiführen.

Gegenüber den verschiedenen Kulturen ergibt sich jedoch ein ganz anderes Verhalten.

Um nun die Wirkung des Bakterienproteins und seinen Effekt bei Tieren zu studieren, habe ich mich weniger Extraktionsmethoden bedient, da mir die geeigneten Mittel fehlten, die es mir ermöglichen, die Proteine nach allen auf Kompression basierenden Systemen herauszuziehen.

(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Ueber die Einwirkung der Bakterien auf verschiedene Zuckerarten.

[Aus der bakteriologischen Untersuchungsstation des Garnisonlazarettes Würzburg.]

Von Apotheker Adalbert Segin.

In einer unter der Leitung des Herrn Stabsarztes und Privatdozenten Dr. Dieudonné ausgeführten Arbeit hat Barsikow¹⁾ zur Differenzierung von Typhus- und Coli-Bacillen zwei mit Lackmus versetzte Nährböden empfohlen, von denen der eine aus Nutrose, Milch-

1) Beiträge zur Differentialdiagnose des Typhusbacillus. (Wiener klin. Rundsch. 1902. No. 44.)

zucker $\bar{a}\bar{a}$ 1,0, NaCl 0,5, Aq. dest. ad 100 besteht, der andere an Stelle von Milchsucker Traubenzucker enthält. Auf beiden Nährböden ruft *B. coli* nach 24 Stunden eine starke Säurebildung und eine massige Ausscheidung von Kasein hervor; *B. typhi* zeigt in der Traubenzuckerlösung dasselbe Verhalten, während es den Milchsuckernährboden unverändert läßt. Klopstock¹⁾ empfahl diesen Nährboden zur Unterscheidung von Typhus-, Coli- und Ruhrbacillen. Sowohl der Typhus wie der Ruhrbacillus läßt den Milchsucker enthaltenden Nährboden dauernd unverändert, während *B. coli* innerhalb 24 Stunden das Kasein ausfällt. In dem mit Traubenzucker versetzten Nährboden ruft *B. typhi* und *B. coli* nach 24 Stunden Säurebildung und Gerinnung hervor, dagegen bewirkt der Ruhrbacillus nur eine geringere Säurebildung und keine Gerinnung, wenigstens nicht in den ersten Tagen. Mittelst des Milchsucker enthaltenden Nährbodens läßt sich also Typhus und Coli, mittelst des mit Traubenzucker versetzten Typhus und Ruhr differenzieren.

Auf Anregung des Herrn Stabsarztes und Privatdozenten Dr. Dieudonné untersuchte ich eine weitere Reihe von Bakterien, und zwar wurden hierzu außer Milch- und Traubenzucker mehrere andere Zuckerarten (Maltose, Galaktose, Fruktose, Raffinose) und diesen ähnlich zusammengesetzte höherwertige Alkohole (Erythrit, Dulcit, Mannit) verwendet. Die Nährböden hatten, entsprechend den Angaben von Barsikow, folgende Zusammensetzung: Zucker (bezw. Alkohol), Nutrose $\bar{a}\bar{a}$ 1,0, NaCl 0,5, Lackmustinktur 10, Aq. dest. ad 100. Die Herstellung geschah stets in der Weise, daß zunächst die Lösung der Nutrose und des Chlornatriums eine Stunde lang sterilisiert, und dann die entsprechende Zucker- bzw. Alkoholart zugefügt wurde. Die in Mengen von ca. 10 ccm abgefüllte Nährflüssigkeit wurde in den Reagenzröhrchen abermals $\frac{1}{4}$ Stunde lang dem strömenden Dampfe ausgesetzt. Diese fraktionierte Sterilisation sollte eine durch zu langes Erhitzen bewirkte, mehr oder weniger tiefgreifende Zersetzung des Zuckermoleküls verhindern, wie eine solche bereits mehrfach bei Milch- und Traubenzucker vermutet wurde. Zu den Milch- und Traubenzuckernährböden, sowie zu denen mit Erythrit und Maltose versetzten verwendete ich eine Lackmustinktur von Kahlbäum-Berlin, zu den übrigen eine von Merck-Darmstadt bezogene.

Tabelle A gibt eine Uebersicht über die gewählten Bakterien und Nährböden. Die auf eine Zeitdauer von 8 Tagen sich erstreckenden Beobachtungen suchte ich durch entsprechend gewählte Zeichen möglichst genau wiederzugeben. So bedeutet das Zeichen —, daß der betr. Nährboden völlig unverändert blieb, bezw. außer dem Wachstum keine bemerkenswerten Veränderungen vor sich gingen, das Zeichen + daß eine ausgesprochene Koagulation des Kaseins eintrat. Tb — bezeichnet eine Trübung, deren Intensität es zweifelhaft erscheinen ließ, ob sie lediglich durch das Wachstum des Bakteriums oder durch eine gleichzeitige unvollständige Kaseinausscheidung hervorgerufen wurde. Wurde oder war gleich von Anfang an diese Trübung so intensiv, daß ihre Entstehung durch Koagulation mehr Wahrscheinlichkeit für sich hatte, so bezeichnete ich diesen Fall mit $\frac{+}{Tb}$. Einige Bakterien verursachten eine eigentümliche, an lilablau erinnernde Färbung des Nährbodens (in der Tabelle durch l bezeichnet), die sehr oft mit der durch das Zeichen $\frac{+}{l}$ symbolisierten Trübung verbunden war; t. E. bedeutet teilweise, v. E. völlige Entfärbung des Nährbodens, s s schwach saure, s stark saure Reaktion. Die Kulturen wurden während der Dauer der Versuche auf 37° gehalten und aus dem Brutschrank entfernt, sobald eine zweifelloste Koagulation eingetreten war.

1) Beitrag zur Differenzierung von Typhus-, Coli- und Ruhrbacillus. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 34.)

Aus Tabelle A geht hervor, daß Milchzucker von verhältnismäßig wenig Bakterien angegriffen wird; einzelne verursachen zwar saure Reaktion, doch genügt die erzeugte Säure anscheinend nicht zur Fällung des Kaseins (*Vibr. cholerae*, *Pneumon. Friedländer*). In viel höherem Maße wie Milchzucker wird Traubenzucker zersetzt. Mit Ausnahme einiger wenigen (*Tetrag. Löde*, *B. faecal. alcalig.*, *Staphyl. pyogen. citr.*) war entweder Säurebildung allein oder, gleichzeitig mit dieser, Koagulation zu konstatieren. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß keines der zu den Versuchen herangezogenen Bakterien Erythrit unter Säurebildung angriff, wie sie bei den anderen Nährböden eintrat; es entstanden wohl Trübungen und mehr oder weniger intensive Niederschläge, doch waren sie stets von dem bereits oben erwähnten Farbumschlag in Lila begleitet (*B. pyocyan.*, *B. subtilis*) und verschwanden bisweilen wieder (*Sarcina lutea*). Auf Maltose wirkt eine erhebliche Anzahl Bakterien unter Säurebildung; die saure Reaktion tritt jedoch bei verschiedenen nur vorübergehend ein (*B. enterit.*, *Staphyl. pyog. alb.*). Auffallend ist der vollständig einer Koagulation ähnliche starke Niederschlag ohne gleichzeitige saure Reaktion (*Typhus*, *B. coli*, *B. icteroïdes*). Er läßt sich vielleicht auf die Weise erklären, daß die erzeugte Säure durch das Natrium der Nutrose (dieselbe ist eine lösliche Kaseinnatriumverbindung) nach der Koagulation neutralisiert wird; dafür spricht auch der Umstand, daß der Ausfällung des Kaseins stets eine Säurebildung vorausging. Eine Koagulation ohne gleichzeitige saure Reaktion konnte ich nur bei Maltose feststellen. Dulcitol wurde ähnlich dem Erythrit sehr wenig angegriffen; eine ausgesprochene Koagulation trat nicht ein. Saure Reaktion war nur vereinzelt wahrzunehmen (*B. acid. lact.*, *B. enterit.*, *Psittacosis*). Die üppig wuchernde *Sarcina lutea* und *Staphyl. pyogen. aur.* ausgenommen, war das Wachstum gering. Galaktose setzt der Einwirkung der Bakterien keinen großen Widerstand entgegen und verhält sich in dieser Beziehung ähnlich dem Traubenzucker und der Fruktose; doch verursacht die aus letzterer Zuckerart erzeugte Säure häufiger Koagulation wie diejenige aus Galaktose. Mannit zeigt insofern ein der Maltose ähnliches Verhalten, als bei ihm sich ebenfalls bisweilen vorübergehende saure Reaktion zeigte (*B. lact. aërog.*, *Pneum. Friedl.*) ohne gleichzeitige Kaseinausscheidung; doch war, wenn eine solche eintrat, dies stets, im Gegensatz zur Maltose, in saurer Lösung der Fall. Raffinose verhielt sich insofern analog dem Dulcitol- und Erythrit, als sie ebenfalls von sehr wenig Bakterien in erheblichem Maße angegriffen wurde und wie die beiden zuletzt genannten keine zweifellose Koagulation aufwies. Bei *Tetrag. Löde* und *Vibr. proteus* Finkler-Prior verschwand die eingetretene Trübung wieder. Hefe Hofbrauhaus (Würzburg) zeigte eine Schichtung, deren obere schwach sauer war, während die untere farblos erschien mit neutraler Reaktion.

Wie ein Blick auf die Tabelle A zeigt, wurden die mit Merckscher Lackmustinktur bereiteten Nährböden sehr häufig und bald entfärbt, während dies bei den Kulturen, die Kahlbaumsche Lackmustinktur enthielten, nur selten der Fall war; für derartige Versuche ist daher der bereits von Drigalski und Conradi¹⁾ empfohlenen Kahlbaum'schen Tinktur der Vorzug zu geben.

1) Drigalski und Conradi, Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXIX.

Tabelle A. (Erklärung der Zeichen und Abkürzungen siehe Text.)
 Nutrosenährboden enthaltend:

Beobachtung nach Tagen	Milchzucker								Traubenzucker							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Staphyl. pyogenes albus	—	s	s	s	s	s	s	s	—	s	s	s	s	s	s	s
Staphyl. pyogenes aureus	—	s	+	—	—	—	—	—	—	s	s	s	+	—	—	—
Staphyl. pyogenes citreus	—	—	—	s	s	s	s	s	—	—	—	—	—	—	—	—
Tetragen. Löde	—	—	—	—	—	l	l	l	—	—	—	—	—	—	—	—
Sarcina lutea	—	—	—	—	—	—	l	l	s	s	s	s	s	s	s	s
Bac. anthrac.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	s	s	s	s	+	+	+
Bact. acid. lact.	+	s	—	—	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—	—
Bact. coli	+	s	—	—	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—	—
Bact. typhi	—	—	—	—	—	—	—	—	s	s	+	—	—	—	—	—
Paratyphus „Bremen“	—	—	—	—	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—	—
Paratyphus Brion-Kayser	—	—	—	s	s	s	s	s	—	—	Tb	+	—	—	—	—
Paratyphus Schottmüller	—	—	—	—	—	—	—	—	s	s	+	—	—	—	—	—
Paratyphus Stamm-Pelzer	s	s	s	s	s	s	s	s	+	s	—	—	—	—	—	—
Bact. faecal. alcalig.	—	—	—	l	l	l	l	l	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. dysenter.	ss	ss	ss	ss	ss	ss	ss	ss	s	s	—	—	—	—	—	—
Bact. enteritidis	—	—	—	—	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—	—
Bact. lactis aërog.	+	s	—	—	—	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—
Bact. icteroides	—	—	—	—	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—	—
Psittacosis	—	—	—	—	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—	—
Pneumon. Friedländer	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	—	—	—	—	—	—
Bact. fluoresc. liquef.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—
Bact. fluor. non liquef.	—	—	—	—	—	ss	ss	ss	—	+	s	—	—	—	—	—
Bact. prodigios.	—	—	—	s	s	—	—	—	—	+	s	—	—	—	—	—
Bact. pyocyan.	—	—	—	—	t. E.	t. E.	t. E.	t. E.	+	+	s	+	+	+	+	+
Bact. syncyan.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	s	s	s	s	s	s
Bact. subtilis	—	—	—	—	—	t. E.	t. E.	t. E.	—	+	s	+	—	—	—	—
Bact. vulg. proteus	—	—	—	—	—	s	s	s	—	—	s	s	s	s	+	+
Bact. vulg. mirabilis	—	—	—	—	—	—	ss	ss	—	—	s	s	s	s	s	s
Vibrio cholerae	—	s	s	s	s	s	s	s	—	s	s	s	s	s	s	s
Vibr. prot. Finkler-Prior	—	—	—	—	—	—	—	—	—	s	s	s	s	s	s	s
Hefe Hofbräuhaus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	s	s	s	s	s	s	s

Nütrosenährboden

Beobachtung nach Tagen	Erythrit								Maltose							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Staphyl. pyogenes albus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Staphyl. pyogenes aureus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Staphyl. pyogenes citreus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tetragen. Löde	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sarcina lutea	—	±	±	†	†	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. anthrac.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. acid. lact.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. coli	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. typhi	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Paratyphus „Bremen“	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Paratyphus Brion-Kayser	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Paratyphus Schottmüller	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Paratyphus Stamm-Pelzer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. faecal. alcalig.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. dysenter.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. enteritidis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. lactis aërogen.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. icteroides	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Psittacosis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pneumon. Friedländer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. fluoresc. liquef.	—	—	†	†	†	†	†	†	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. fluor. non liquef.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. prodigios.	—	—	†	†	†	†	†	†	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. pyocyan.	—	±	±	†	†	†	†	†	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. syncyan.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. subtilis	—	†	†	†	†	†	†	†	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. vulg. proteus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. vulg. mirabilis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Vibrio cholerae	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Vibr. prot. Finkler-Prior	—	—	—	†	†	†	†	†	—	—	—	—	—	—	—	—
Hefe Hofbräuhaus	Tb	Tb	Tb	Tb	Tb	Tb	Tb	Tb	—	—	—	—	—	—	—	—

Nutrosenährboden

Beobachtung nach Tagen	Fruktose							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Staphyl. pyogenes albus	—	—	Tb s	Tb s	Tb t. E.	Tb t. E.	Tb t. E.	Tb t. E.
Staphyl. pyogenes aureus	ss	ss	ss	ss	s	s	s	s
Staphyl. pyogenes citreus	—	+	s	—	—	—	—	—
Tetragen. Löde	—	ss	ss	t. E.	t. E.	t. E.	Tb t. E.	Tb t. E.
Sarcina lutea	1	Tb s	Tb s	Tb s	Tb t. E.	Tb t. E.	Tb t. E.	Tb v. E.
Bac. anthrac.	—	ss	ss	t. E.	t. E.	t. E.	t. E.	t. E.
Bact. acid. lact.	—	+	s	—	—	—	—	—
Bact. coli	—	s	+	—	—	—	—	—
Bact. typhi	—	+	s	—	—	—	—	—
Paratyphus „Bremen“	—	+	s	—	—	—	—	—
Paratyphus Brion-Kayser	—	—	+	—	—	—	—	—
Paratyphus Schottmüller	—	+	+	+	+	—	—	—
Paratyphus Stamm-Pelzer	—	+	s	+	+	—	—	—
Bact. faecal. alcalig.	—	—	t. E.	t. E.	t. E.	v. E.	v. E.	v. E.
Bac. dysenter.	—	—	s	s	+	—	+	+
Bact. enteritidis	ss	s	s	s	s	s	+	+
Bact. lactis aërogen.	—	ss	s	s	s	s	s	s
Bact. icteroides	—	+	s	—	—	—	—	—
Psittacosis	—	+	s	—	—	—	—	—
Pneumon. Friedländer	—	+	+	—	—	—	—	—
Bact. fluoresc. liquef.	—	—	s	s	+	+	+	+
Bact. fluor. non liquef.	—	—	t. E.	t. E.	t. E.	ss	ss	ss
Bact. prodigios.	—	+	+	+	—	—	—	—
Bact. pyocyan.	—	—	Tb s	Tb s	Tb s	Tb t. E.	Tb t. E.	Tb t. E.
Bact. syncyan.	—	—	—	s	+	+	+	+
Bact. subtilis	—	+	+	+	+	—	—	—
Bact. vulg. proteus	—	+	—	—	—	Tb s	Tb s	Tb s
Bact. vulg. mirabilis	—	Tb	Tb	Tb	Tb	Tb	Tb	Tb
Vibrio cholerae	—	—	+	+	+	+	+	+
Vibrio proteus Finkler-Prior	—	Tb s	Tb s	Tb s	Tb t. E.	Tb t. E.	Tb v. E.	Tb v. E.
Hefe Hofbräuhaus	—	+	+	+	+	+	+	+

In dem Verhalten von Typhus und Paratyphus gegenüber den verschiedenen Zuckerarten zeigten sich im allgemeinen keine scharfen Gegensätze. Im Milchzucker-, Dulcit- und Raffinosenährboden trat weder bei *B. typhi* noch bei den verschiedenen Paratyphusstämmen (Paratyphus Bremen, P. Brion-Kayser, P. Schottmüller, P. Stamm-Pelzer) ausgesprochene Koagulation ein, nur bei einigen Säurebildung; andererseits verursachten in Traubenzucker-, Fruktose- und Mannitnährböden sämtlich vollständige Kaseinausscheidung, in Galaktosenährboden nur Typhus, Paratyphus Bremen und P. Stamm-Pelzer vollständige, die beiden anderen nur unvollständige Koagulation. Erythrit greifen sie überhaupt nicht an, und nur in ihrem Verhalten zu Maltose war insofern ein bemerkenswerter Unterschied festzustellen, als P. Stamm-Pelzer und P. Schottmüller diese Zuckerart nicht zersetzten, P. Brion-Kayer teilweise, Typhus und P. Bremen vollständige Koagulation bewirkten.

Um einen Anhaltspunkt über die Menge der gebildeten Säure zu erhalten, wurden einige Kulturen, die Säurebildung ohne Koagulation zeigten, und einige andere, die beide Erscheinungen gleichzeitig aufwiesen, mit $\frac{100}{n}$ Kalilauge titriert. Von den nicht koagulierten pipettierte ich 5 ccm ab, die koagulierten wurden zuerst filtriert. Die in Tabelle B angegebenen Zahlen beziehen sich auf 100 ccm Kultur.

Tabelle B. (Zeichen und Abkürzungen wie bei Tab. A.)

Titration der nach 8 Tagen gebildeten Säuremenge mit $\frac{100}{n}$ KOH
Nütrosenährböden.

	Milchzucker	Traubenzucker	Erythrit	Maltose	Dulcit	Galaktose	Fruktose	Mannit	Raffinose
Staphyl. pyog. alb.	- s 3,4	- s 3,8	Keine Säurebildung		+ s 2,4		+ s 2,1	+ s 1,5	
Bact. acid. lact.	+ s 3,4	+ s 5,2							
Bact. coli	+ s 4,5	+ s 4,2					- s 4,8	+ s 1,6	
Parat. „Bremen“							+ s 3,2		- s 2,6
Bact. enterit.						- s 1,8			
Bact. lact. aérog.								- s 0,8	
Bact. icteroides									+ s 1,6
Pneum. Friedl.					- s 2,6				- s 2,2
Bact. fluor. liq.									
Bact. vulg. prot.									- s 1,8
Vibr. cholerae	- s 4,0	- s 4,4		- s 2,9		- s 2,8			- s 2,4

Diese Beispiele zeigen, daß die Menge der erzeugten Säure bei den geprüften Bakterien nicht allzusehr differiert; da trotzdem die Säurebildung nicht immer Koagulation verursachte, so dürfte der Grund dieser Erscheinung wohl darin liegen, daß für die Kaseinfällung nicht allein die Menge, sondern auch die Art der gebildeten Säure maßgebend ist. In ähnlichem Sinne haben sich bereits Blachstein¹⁾ und P é r é²⁾ geäußert.

1) Archives des sciences biologiques publ. par l'Institut impér. à St. Pétersbourg. T. I. No. 1, 2 et 3.

2) Annales de l'Institut Pasteur. 1892 et 1893. Compt. rend. de la soc. de biol. 1897. p. 446.

Tabelle C. (Zeichen und Abkürzungen wie bei Tab. A.)
Serumnährboden, enthaltend:

Beobachtung nach Tagen	Milchzucker								Traubenzucker							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Staphyl. pyog. alb.	ss	+	+						ss	+						
Staphyl. pyog. aur.	—	+							—	+						
Staphyl. pyog. citr.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+					
Tetrag. Löde	—	s	s	s	+	+			—	+						
Sarcina lutea	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+					
Bact. anthracis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+					
Bact. acid. lactic.	+	+							+	+						
Bact. coli	+	+							+	+						
Bact. typhi	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+						
Paratyphus Bremen	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+						
Parat. Brion-Kayser	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+						
Parat. Schottmüller	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+						
Parat. Stamm-Pelzer	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+						
Bact. faecal. alcalig.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. dysenteriae	—	—	—	—	s	s	s	s	+	+						
Bact. enteritidis	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+						
Bact. lact. aërogen.	s	s	+	+					+	+						
Bact. icteroides	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+						
Psittacosis	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+						
Pneumon. Friedländer	—	—	—	ss	ss	s	s	s	+	+						
Bact. fluor. liquef.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. fluor. non liquef.	—	s	s	s	s	s	s	s	+	+	+					
Bact. prodigios.	—	—	—	s	s	s	+	+	ss	+	+					
Bact. pyocyan.	s	s	s	s	s	s	t. E.	v. E.	—	+	+					
Bact. syncyan.	—	ss	s	+					—	+	+					
Bact. subtilis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+				
Bact. vulgare proteus	—	—	—	—	s	s	s	s	+	+	+					
Bact. vulgare mirabilis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+			
Vibrio cholerae	—	—	ss	ss	ss	s	s	s	+	+	+	+				
Vibr. prot. Finkler-Prior	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+				
Hefe Hofbrauhaus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+				

Nachdem, wie Hanna¹⁾, Dieudonné²⁾, Hanson und Russell³⁾ gezeigt haben, auch in verdünnten, mit Zucker versetzten Blutserumnährböden durch Einwirkung der von *B. coli* und anderen Bakterienarten gebildeten Säuremengen eine intensive Fällung des Eiweißes eintritt, benutzte ich zum Vergleiche zwei Nährböden folgender Zusammensetzung: Rinderblutserum, Lackmustinktur (Kahlbaum) ää 10, Aq. dest. 79,0 Milch- bzw. Traubenzucker 1,0. Dieselben wurden in der gleichen Weise wie die Nutrosenährböden hergestellt, eine Koagulation während des Sterilisierens trat nie ein. Zu den Versuchen benutzte ich dieselben Bakterien wie bei Nutrosenährböden. Tabelle C gibt die gemachten Beobachtungen wieder.

Ein Vergleich des Serummilchzuckernährbodens mit dem Nutrosenmilchzuckernährboden zeigt bei den meisten Bakterien ähnliches Verhalten. Die Säurebildung des Serumnährbodens führt jedoch öfters zur vollständigen Koagulation wie diejenige des Nutrosenährbodens (Tetrag. Löde, *B. syncyan.*, *Staphyl. pyog. alb.*). In noch höherem Maße ist dies in den entsprechenden Traubenzuckernährboden der Fall; so findet sich im Nutrosetraubenzuckernährboden eine Reihe von Bakterien (*Vibr. cholerae*, Tetrag. Löde, *Sarcina lutea*, *B. vulg. mirab.*, *B. syncyan.*, *Staphyl. pyog. citr. und alb.*, *Vibr. prot. Finkler-Prior*, Hefe Hofbrauhaus), die nur Säurebildung bewirken, während sie im Serumtraubenzuckernährboden vollständige Koagulation verursachen. Da die verschiedenen Nährböden mit denselben Reinkulturen geimpft waren, und stets unter den gleichen Bedingungen kontrolliert wurden, so bleibt für die Tatsache, daß in den Serumnährböden die Koagulation häufiger war als in den korrespondierenden Nutrosenährböden, nur die Annahme übrig, daß die im Rinderblutserum enthaltenen Eiweißkörper durch Säure weit leichter ausfällbar sind als das Kasein der Nutrose.

Nachdruck verboten.

Ueber säurefeste Bacillen bei *Python reticularis*.

Von Prof. v. Hansemann.

Das gesteigerte Interesse, das man neuerdings säurefesten Bakterien entgegenbringt und besonders eine Untersuchung von Lydia Rabinowitsch in diesem Centralbl. (Bd. XXXIII. 1903. No. 8) veranlassen mich zu folgender, leider nicht erschöpfender Mitteilung. Es handelt sich um den Befund solcher Bacillen bei einer *Python reticularis*, die im hiesigen Aquarium gestorben und die mir von Herrn Direktor Hermes freundlichst überlassen wurde zu vergleichend anatomischen Untersuchungen.

Bei der Sektion fand sich in der Bauchhöhle, mit dem Netz zusammenhängend in der Nähe des Pankreas ein traubenförmiger Körper, der aus einer großen Zahl bis erbsengroßer Knoten bestand. Die Ähnlichkeit, die makroskopisch mit Perlsucht bestand, veranlaßte mich zu

1) Journal Pathol. Bacteriol. 5.

2) Hygien. Rundschau. 1902.

3) The Medical News, 1903. febr.

weiterer mikroskopischer Untersuchung. Dabei stellte sich zuerst heraus, daß mikroskopisch diese Aehnlichkeit mit Perlsucht keineswegs bestand, vielmehr erwies sich das Gewebe als ein von Rundzellen reichlich durchsetztes Granulationsgewebe, in dem sich keine Verkäsung, keine Riesenzellen und auch keine Verkalkung erkennen ließ. Wohl fanden sich einige nekrotische Herde, die durch eiterigen Zerfall hervorgerufen waren, aber nicht durch Verkäsung. Schon bei schwacher Vergrößerung konnte man in der Umgebung der eiterig zerfallenen Partie größere Zellen erkennen mit eigentümlich körnigem Protoplasma. Mit den gewöhnlichen Färbungsmethoden ließen sich Bakterien nicht darin nachweisen, dagegen zeigten sich nun bei Anwendung Ziehlscher Lösung und Nachbehandlung mit Gabbetscher Lösung eine große Menge rot gefärbter Stäbchen, die in Form und Größe durchaus den Tuberkelbacillen glichen. Dieselben sind einzeln oder in Gruppen zusammengelagert, zum Teil auch mit ihrem Ende sich berührend. Die meisten Stäbchen sind in ganzer Ausdehnung rot gefärbt, einige aber zeigen punktförmige Unterbrechungen, wie solche bei Tuberkelbacillen so häufig sind. Durch diese Färbung ließ sich nun feststellen, daß die eigentümlichen Granulationen, die man bei gewöhnlicher Zellfärbung in den großen Zellen sah, auf die Anhäufung säurefester Bacillen in diesen Zellen zurückzuführen ist.

Diese großen Zellen mit ihrem Bakteriengehalt erwiesen sich als morphologisch übereinstimmend mit den Leprazellen. Leider war dieser Bacillenfund erst erhoben, als das gesamte Material schon gehärtet war, so daß Impfversuche nicht mehr angestellt werden konnten. Es bleibt daher unaufgeklärt, ob diese Bacillen mit Tuberkelbacillen identisch sind oder ob es sich hier um einen von dem Tuberkelbacillus differenten säurefesten Bacillus handelt. Das erstere ist besonders deswegen zweifelhaft, weil ein von der Tuberkulose gänzlich differentes Krankheitsbild entstanden war. In beiden Fällen aber ist dieser Befund bemerkenswert, da auch Tuberkulose bei den Kaltblütern nicht zu den häufigen Erscheinungen gehört. Vielleicht gelingt es bei weiteren Untersuchungen, die gleiche Affektion wieder aufzufinden und dann die hier bestehenden Lücken auszufüllen.

Nachdruck verboten.

Bacterium muris.

[Aus der I. deutschen medizinischen Klinik in Prag.
(Vorstand: Hofrat Prof. Příbram.)]

Von Dr. L. Zupnĭk, klin. Assistenten.

In Bezug auf die in No. 7 dies. Centralbl. (Bd. XXXIII) erschienene Publikation von E. Klein: „Ein neuer pathogener Mikrobe zur Gruppe der Diphtheriebacillen gehörig = *Bacterium muris*“ erlaube ich mir darauf hinzuweisen, daß wir im Jahre 1897 im hiesigen hygienischen Institute (Prof. Hueppe) eine Epidemie unter weißen Ratten zu verzeichnen hatten, als deren Erreger sich ein plasmolysiertes Stäbchen herausgestellt hat. Es bildete das letztere den Ausgangspunkt einer Reihe von experimentellen Untersuchungen über Diphtheriebacillen, deren

Endergebnis im vorigen Jahre in der Prager med. Wochenschrift unter dem Titel: „Die Aetiologie der Diphtherie“ niedergelegt wurde.

Die plasmolysierten Bakterien wurden daselbst in zwei natürliche Gruppen oder, wie ich es heute richtiger zu nennen glaube¹⁾, in zwei Gattungen eingeteilt, und zwar die Loefflersche und Hoffmann-Wellenhoffsche. Jede derselben enthält eine größere Anzahl von natürlich verwandten Arten. Die Erreger unserer Rattenseuche gehörten der Loefflerschen Gattung an.

Nachdruck verboten.

Massenerkrankung bei Enten mit eigenartigem Diphtheriebacillenbefund der Conjunctiva.

[Aus dem Königl. hygienischen Institute in Posen.
Direktor: Medizinalrat Prof. Dr. Wernicke.]

Von Dr. **Kampmann**,
Kgl. Kreistierarzt, Posen.

Dr. **Hirschbruch** und Dr. **Lange**,
Assistenten des Institutes.

Anfangs August 1902 trat unter den Enten des Rittergutes Poklatki, Kr. Schroda, eine eigenartige Krankheit auf, indem zu Anfang einige Tiere trübe Augen zeigten, eine gewissermaßen nervöse Unruhe bekundeten, fortwährend mit dem Kopf unter das Gefieder fuhren und denselben beständig zu reinigen sich bemühten.

Zunächst wurde dem Auftreten der krankhaften Erscheinungen wenig Bedeutung zugemessen, da bei einem größeren Geflügelbestande sich immer Störungen der Gesundheit in dieser oder jener Form sowohl im Frühjahr während der Brutzeit als auch im Sommer und bis in den Herbst hinein bei dem jungen Nachwuchs einzustellen pflegen, welche, wenn sie nicht in seuchenartiger Weise und unter größerer Sterblichkeit auftreten, als ein notwendiges Uebel bei jeder Geflügelzucht angesehen werden.

Der krankhafte Zustand nahm indessen mit jedem Tage an Verbreitung zu, und zwar befiel derselbe merkwürdigerweise ausschließlich die Enten, obschon dieselben mit anderem Geflügel, mit Hühnern, Perlhühnern und Puten zusammenlebten, denselben Futterplatz und zum Teil dieselben Futtertröge benutzten, und sogar mit dem genannten Geflügel denselben Stall bewohnten. Zunächst wurden die jüngeren Tiere im Alter von 3—4 Wochen befallen; allmählich erkrankten auch die 2—3 Monate alten Tiere, ja selbst auf ältere Zuchtenten erstreckte sich das Leiden, so daß von dem ca. 240 Stück starken Bestande mehr als 40 Proz., also etwa 100 Tiere erkrankten und von diesen etwa 25 Proz. der Krankheit erlagen.

Bezüglich der Entstehung der Krankheit mußte es zweifelhaft erscheinen, ob dieselbe als eine seuchenhafte resp. spezifisch ansteckende Geflügelkrankheit zu betrachten sei, weil die Tatsache vorlag, daß nur die Enten erkrankten, während das andere Geflügel von der Krankheit verschont blieb; es wurde dem klinischen Krankheitsbilde entsprechend die Diagnose: „eitrig-nekrotische Conjunctivitis“ gestellt.

¹⁾ cf. Ueber die Tuberkulinreaktion. (Dtsch. Archiv f. klin. Med. Bd. LXXVI. 1903. Heft 1—3.)

Das Krankheitsbild ist folgendes:

Nach den oben beschriebenen Anfangsstadien, der Trübung der Augen, der Unruhe, dem ewigen Putzen des Kopfes, zeigt sich nach wenigen Tagen schon eine entzündliche Affektion des Lidsackes der Augen und des Augapfels; es beginnt sich im Lidsack zunächst flüssiges, weißgelbes, getrübbes Sekret anzusammeln, welches aus den Augen abfließt, und am Schnabel entlang bis zum Schnabelrande herabrinnt, oftmals in die Nasenöffnung gelangt, auch wohl in die Mundhöhle.

Mit der zunehmenden Sekretabsonderung tritt bald eine Aenderung in der Beschaffenheit des Sekrets ein; dasselbe wird an der Luft dicker und nimmt eine erst mehr gelbe, dann mehr schmutzigbraune Farbe an, es wird trockener, und die kranken Tiere bemühen sich in einemfort, diese Absonderungsmassen aus den Augen zu entfernen, sie schlagen mit dem Kopfe seitwärts und schleudern so die Augensekrete fort, schieben den Kopf unter die Flügel und zeigen eine dauernde Unruhe; merkwürdigerweise sieht man die Tiere fast nie sich mit den Fußzehen die Augen putzen.

Mit der zunehmenden Sekretabsonderung stellen sich dann Begleiterkrankungen am Augapfel ein, es entstehen entzündliche Reizungen der Cornea, des Blinkknorpels, die Augenlider verkleben und das Sekret wirkt zerstörend auf die durchsichtige Hornhaut; es kommt zur Geschwürsbildung, die Cornea wird oftmals perforiert, die vordere Augenkammer entleert ihren Inhalt, es tritt Kollaps der Cornea ein und damit ist ein Grad der Krankheit erreicht, der für das Tier verhängnisvoll wird, weil es zur Verödung des Augapfels, zur Blindheit führt.

Mit den ersten Erkrankungen der Conjunctiva stellen sich dann noch weitere Begleiterscheinungen ein; das Sekret der Augen wird durch das Schleudern mit dem Kopfe aus den Lidspalten wohl möglichst entfernt, es bleibt aber meistens am Körper des Tieres haften und zwar zum größten Teile an den Flügeln, sowohl an deren oberen als auch an den unteren Flächen; es klebt im Gefieder fest, trocknet ein, reizt die äußere Haut, bringt eine Entzündung der Oberhaut zu stande, diese pflanzt sich fort auf die Unterhaut und die Wurzeln der Federn, es entsteht ein Ekzem, welches große Ausdehnung gewinnt. Es fallen zunächst die Flaumfedern, später auch die Flugfedern aus, die Flügel werden schließlich kahl und sind mit harten borkigen Krusten bedeckt.

Je intensiver die Conjunctivitis sich zeigt, je mehr Sekret abgesondert wird, je größer der Reizzustand ist, der sich am erkrankten Auge und um dasselbe herum abspielt, um so umfangreicher ist auch die sekundäre ekzematöse Erkrankung der Flügel bzw. der äußeren Haut, die sich nicht selten über den ganzen Rücken hin ausdehnt und sich an der oberen Halsseite bis zum Kopfe fortsetzt.

Mit der heftigen Erkrankung der Augen tritt nun ein natürlicher Vorgang in die Erscheinung; die kranken Tiere beginnen sehr schnell abzumagern; zunächst, wenn erst die katarrhalische Form der Conjunctivitis eingetreten ist, gehen die Patienten noch ins Wasser. Fängt aber der Zustand der Verklebung der Lidspalten an sich einzufinden, dann finden sich die Tiere nicht mehr zurecht, sie können nicht sehen, stolpern über den Weg, stoßen an Sträuchern etc. an und vermeiden das Wasser, sie sitzen dann vorzugsweise auf trockenem Boden, wenns geht im Sonnenschein und sind ununterbrochen beschäftigt, sich des Augensekrets resp. der eingetrockneten Massen zu entledigen.

Damit ist dann das Stadium erreicht, welches für die Tiere das

kritische wird, da die selbstredend eintretende mangelnde Ernährung schließlich zum Tode führen muß.

Der Verlauf der Krankheit ist demnach kein rascher, im Gegenteil, es gehen Tage und Wochen hin, bis die Krankheit sich entwickelt, ihre Höhe erreicht, sich zum Bessern wendet und in Heilung ausgeht oder einen tödlichen Ausgang nimmt.

Bei einer Anzahl kranker Tiere beschränkten sich die Sekundärerscheinungen aber nicht allein auf die oben beschriebenen Hautaffektionen, sondern es treten noch schwere Störungen in den Werkzeugen der Futterraufnahme ein, insbesondere zeigt sich der Schnabel der Enten für die Einwirkungen des Augensekrets sehr empfindlich. Besonders der Oberschnabel zeigt häufig Erkrankung in seiner Substanz.

Es treten Deformationen auf, der Rand des Schnabels zerfällt gangränartig, der Schnabel nimmt eine andere Form an, biegt sich oben oder seitwärts um, die Ränder schließen nicht mehr mit dem Unterschnabel, und so wird das kranke Tier auch an der normalen Futterraufnahme gehindert.

Erkrankungen an den Schleimhäuten der Schnabelhöhle, des Rachens oder des Schlundes sieht man nicht auftreten, auch Störungen in den Absonderungen, wie man solche bei krupös-diphtheritischen Darmaffektionen, als Durchfall und dergl. auftreten sehen kann, sind nicht beobachtet worden

Es kann der Verlauf der Krankheit etwa in drei Stadien eingeteilt werden:

- 1) das ansteigende Stadium, welches einen Zeitraum von 4—10 Tagen umfaßt;
- 2) das Höhenstadium von der zweiten Woche bis zum höchsten und oftmals tödlichen Grad der Krankheit;
- 3) das Rekonvaleszentenstadium; dies umfaßt eine verschieden große Zeitspanne und richtet sich je nach dem Grade, wie das befallene Individuum durch die Krankheit in seinem Ernährungszustande zurückgekommen ist.

Hat ein krankes Tier im Verlaufe der Krankheit wenigstens eine unversehrte durchsichtige Hornhaut behalten, oder ist wenigstens eine nicht perforiert oder total getrübt worden, dann tritt mit Aufhören der Sekretbildung auch in verhältnismäßig kurzer Zeit das Stadium quod antea ein.

Die Tiere, welche sterben, sind natürlich ausnahmslos sehr abgemagert und blutarm.

Die inneren Organe sind ziemlich unverändert, haben ein normales Aussehen und sind höchstens mehr oder weniger atrophiert, leichte parenchymatöse Trübungen der Leber sind das einzige Augenfällige.

Die Krankheit hat im Verlaufe des Sommers bis in den Herbst hinein unter den Enten des genannten Dominiums bestanden. Von den ca. 240 vorhandenen Enten waren bis zum Herbst, wie oben schon erwähnt, ca. 100 Tiere erkrankt und von diesen 25 Proz. gestorben, 15 Proz. der erkrankten Tiere wurden im Initialstadium geschlachtet und ca. 60 Proz. sind wieder gesund geworden. Im Herbst ist dann die Krankheit erloschen bzw. es sind keine neuen Erkrankungsfälle vorgekommen.

Von gleichen Erkrankungen unter den Enten anderer Besitzer in der Gegend ist nichts bekannt geworden. Auch die angestellten Nachforschungen haben ein negatives Resultat gehabt.

Die kranken Enten haben, wie gesagt, trotz innigster Berührung mit dem sonstigen Geflügel des Gehöfts, dieses nicht infiziert, eine Erscheinung, die mit großer Wahrscheinlichkeit zu dem Schlusse berechtigt, daß die Ursache der Krankheit an einem Ort zu suchen ist, welcher von dem sonstigen Geflügel nicht besucht wird, und die kann nur in Frage kommen, ob von den Teichen des Gutes, in welchen die Enten sich aufgehalten haben, die Krankheitsursache abzuleiten ist.

Diese Vermutung hatte um so mehr ihre Berechtigung, als die gesamten Stallungen, in denen das Geflügel untergebracht war, und welche früher als Schweineställe benutzt worden waren, bald nach den ersten schweren Krankheitsfällen gründlich desinfiziert wurden und wochenlang nicht zur Aufnahme des Geflügels dienten.

Das ganze Krankheitsbild, der Verlauf und das Wesen der Krankheit ließen darauf schließen, daß eine Erkrankung vorliege, welche bakteriellen Ursprungs ist.

Entsprechend der Vermutung, daß die Grundlage für das ganze Krankheitsbild in der Erkrankung der Augen liege, haben wir uns auch zunächst der Untersuchung des Augensekrets zugewandt. In Ausstrichpräparaten der dünnflüssigen, ein wenig fadenziehenden, kleine gelbweisse Bröckel enthaltenden Flüssigkeit fiel vor allem der völlige Mangel von Eiterkörperchen auf. Um so reichlicher war der Gehalt an Bakterien. Eine einzige das Bild beherrschende Bakterienart war nicht zu finden. Der Hauptsache nach handelte es sich um Kurzstäbchen, hie und da mit Andeutung von Keilform, und um Diplokokken. Die Färbung nach Gram ergab ebenfalls vorläufig noch kein irgendwie verwertbares Resultat.

Mit dem Material wurden Glycerinagarplatten gegossen und einige Serumplatten bestrichen. Außerdem wurde eine weiße Maus mit einer Oese Sekret subkutan geimpft. Da sich auf den Serumplatten am nächsten Morgen gutes Wachstum verschiedener Bakterienarten zeigte, und da sich auf den Glycerinagarplatten keine Art vorfand, die nicht auf dem Löffler-Serum besser gewachsen ist, haben wir für die Weiterbearbeitung unserer Aufgabe die Serumplatten benutzt.

Die Maus blieb gesund.

Unter im ganzen fünf verschiedenen Arten, die nach der Häufigkeit der von ihnen gebildeten Kolonien überhaupt als mutmaßliche Erreger in Betracht kommen konnten, erregte ein Stamm unser besonderes Interesse. Es waren kurze, keilförmige Stäbchen mit diphtheriebacillenähnlicher Anordnung im Präparate, die auf gewöhnlichem Bouillonagar gut wachsen und einen matten, graugelblichen Belag bilden. Sie überziehen das Kondenswasser des Röhrchens mit einem leicht gekräuselten, sich an der Glaswand emporschiebenden Häutchen.

Diese Aehnlichkeit des Agarstriches mit der bekannten Wachstumsform vieler säurefester Bacillen ließ uns zunächst vermuten, daß es sich um derartige Mikroorganismen handle. Die weitere Untersuchung ergab nach dieser Richtung ein negatives Resultat. Die schon in der Lagerung ausgesprochene Aehnlichkeit mit den Diphtheriebacillen veranlaßte uns, in zweiter Linie die eventuelle Zugehörigkeit unseres Stammes zur Diphtheriegruppe genauer zu studieren.

Dabei fanden wir, daß sich besonders auf Löffler-Serum sehr viel größere Stäbchen als auf Agar bilden, welche sehr schöne Keulenform und Bänderung (wässeriges Methylenblau) bei typischer Lagerung aufweisen. Auch die Babes-Ernstschen Körperchen sind durch die

Neissersche Färbung prompt nachweisbar, und zwar schon zu einer Zeit, in der ihr Auftreten als für echte Diphtheriebacillen charakteristisch bezeichnet wird. Wir glaubten auf unserer Serumplatte, da wir stets nur diphtheroide Stäbchen im mikroskopischen Präparate sahen, mit einer Reinkultur zu arbeiten. Als wir dann zum Zwecke der Beobachtung des Kolonienwachstums Glycerinagarplatten gossen, traten zu unserem Erstaunen dreierlei wohldifferenzierte Arten von Kolonien zu Tage.

Zunächst fanden wir nach 24 Stunden bis linsengroße, flache, grauweiße, matte Kolonien mit unregelmäßig gekräuseltem Rand, die nur durch ihren matten Glanz entfernt an Kolonien echter Diphtheriebacillen erinnerten. Ein Nabel war meist deutlich ausgebildet. Bei schwacher Vergrößerung sahen wir grobgranuliertes Gefüge, scharfzackigen Rand. Die Kolonien waren mäßig lichtdurchlässig bei grauweißer Färbung. Die Untersuchung der einzelnen Bakterien im hängenden Tropfen und im gefärbten Präparate ergab, daß es sich um Mitglieder der Diphtheriegruppe handelte.

Von diesem Typus A war leicht eine zweite Art von Kolonien zu trennen. Es handelte sich um knopfförmig über die Oberfläche des Agars emporragende, sehr kleine, glänzende, glattrandige Kolonien, die schwache, graugelbe Färbung besitzen (Typus B).

Bei genauer Durchforschung der Platten ließ sich noch ein dritter Typus (C) auffinden, der sich in seinen Agarkolonien von B nur durch seine etwas größeren Ansiedelungen von deutlich gelber Farbe unterschied, die bei schwacher Vergrößerung (ebenso wie B) wenig Licht durchließen und dunkelgrau-bräunlich waren.

Typus B und C bestanden im Gegensatz zu A aus verhältnismäßig kleinen Formen, die aber nach Form und Lagerung ebenfalls deutlich diphtheroïdes Gepräge besaßen. Die Unterscheidung von B und C auf der Agarplatte erforderte aber doch recht genaue Beobachtung und war nicht immer mit absoluter Genauigkeit möglich trotz der oben angegebenen Merkmale.

Ganz anders und sehr leicht war im Gegensatz hierzu die Unterscheidungsmöglichkeit auf der Löfflerschen Blutserumplatte. A wächst hier viel üppiger als echte Diphtherie und hat gegenüber dem leicht gelblichen Ton dieser Bakterien eine ausgesprochen weißgraue Färbung. Auch der Glanz ist bei unserem Stamm A um ein geringes weniger matt, als bei den Löfflerschen Bacillen.

B und C sind auf der Serumplatte ohne weiteres vom Typus A zu unterscheiden, da sie hier in ganz besonders intensiver Weise Farbstoff bilden. Die Kolonien vom Stamm B sind deutlich strohgelb bis wachsfarben, während die Ansiedelungen von C schon von den kleinsten an eine erheblich sattere Färbung als die ersteren besitzen. Bei größeren Kolonien ist der Unterschied der Farbe besonders schön. Die Bakterienrasen vom Diphtheroïd C sind dann durch ein schönes leuchtendes Goldorange ausgezeichnet. B kommt auch an ganz alten Kolonien nie über eine — wenn auch etwas kräftigere — wachsgelbe Färbung hinaus.

Eine Serumplatte, die mit Bouillonaufschwemmung eines Gemisches von allen 3 Stämmen beschickt ist, gewährt aber nicht bloß durch die verschiedenartige Färbung der einzelnen Kolonien, sondern noch mehr fast bei dichter Besäung durch das von Tag zu Tag wechselnde Kolorit ein ganz eigenartiges und höchst interessantes Bild. Die Schnelligkeit des Wachstums der drei Stämme erfolgt in derselben Reihenfolge, wie wir sie aufgezählt haben. Der Abstand zwischen A und den farbstoff-

bildenden Pseudodiphtheriebacillen ist hierbei ein besonders großer; weniger deutlich ist der Unterschied zwischen B und C. Eine Platte mit Mischkultur durchläuft allmählich alle Schattierungen vom leichtesten hellgrau über gelbgrau, strohgelb und orange bis zum kräftigen goldorange.

Beim genauen morphologischen Studium der auf Serum gewachsenen Arten wurden folgende Unterschiede festgestellt;

Die Bacillen des Typus A zeichnen sich dadurch aus, daß sie besonders große Formen mit ausgeprägter Keulenbildung zeigen. Das Einzelbakterium ist etwa $1\frac{1}{2}$ mal bis doppelt so lang wie das echte *Corynebacterium diphtheriae* und zeigt sich ihm bei Klatschpräparaten in der Lagerung ganz analog. Hierher rechnen wir in erster Linie die bekannte staketenartige Anordnung in Reihen; aber auch die Aneinanderfügung zweier oder dreier Keulen, die sich mit ihren schmalen Enden zu berühren scheinen, ist oft und schön zu finden. Dabei zeigt das Bakterium vom Stamme A schon bei einfacher Methylenblaufärbung eine schöne Bänderung. Die einzelnen Bänder sind verhältnismäßig breit und scharf abgegrenzt. Wir haben — wie das ja für viele Vertreter der Diphtheriegruppe schon bekannt ist — die großen und eigenartigen Formen in Präparaten von alten Kulturen gesehen. Die Babes-Ernstschen Körperchen treten in erheblicher Zahl und als große Gebilde schon auf 13-stündigen Rinderblutserumplatten (37°) auf, leicht nachweisbar durch die bekannte Neissersche Färbung. Auf 23-stündigen Kulturen ist es fast schwer, einen Bacillus ohne Polkörperchen zu finden. Bei ganz alten Kulturen, die nach ein- bis mehrtägigem Stehen im Brutschranke im Zimmer aufbewahrt worden sind, geht die relative Zahl der Körperchen wieder zurück bis zu fast völligem Verschwinden.

Im Gegensatz zu diesem Typus A besitzt der 2. Stamm die kleinsten Formen. Die auf Serum gewachsenen Bakterien sind nur $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ so groß wie echte Diphtheriebacillen gleichen Alters, die sich auf demselben Nährboden entwickelt haben. Die Bakterien des Stammes C sind wieder etwas größer und plumper als B, so daß auch im gefärbten Klatschpräparate einer Mischkulturplatte ohne zu große Schwierigkeit die Kolonien der farbstoffbildenden Bakterien voneinander unterschieden werden können. Keulenbildung und typische Lagerung sind bezeichnend für die Zugehörigkeit zur Diphtheriegruppe. Auch die gelegentliche Lagerung in zwei Gliedern, die mit den schmalen Enden sich berühren und die Schenkel eines stumpfen Winkels bilden, fehlt ebensowenig wie die allerdings noch seltenere Bildung eines dreistrahligen Sterns. Die Bänderung und septierte Färbung bei Typus B und C ist nicht so deutlich wie bei den echten Diphtheriebacillen und noch weniger wie bei unserem Stamme A. Bei beiden farbstoffbildenden Arten können von 23 Stunden an sehr vereinzelte Polkörperchen durch Färbung nach Neisser nachgewiesen werden.

Alle Merkmale, welche der Diphtheriegruppe eigentümlich sind, gehören auch unseren 3 Arten an, insbesondere die Färbbarkeit nach Gram und die mangelnde Beweglichkeit; Milch wird nicht zur Gerinnung gebracht, Gelatine nicht verflüssigt.

Die erste Form zeigt auf allen Nährböden ein schwächeres Wachstum, wenn das Impfmateriale aus einer alten Bouillonkultur stammt, als wenn die Kultur noch jung ist. Ein Unterschied zwischen dem Wachstum von altem und jungem Impfmateriale läßt sich beim Typus A in

Bouillon feststellen. Während nämlich frische und lebenskräftige Bacillen in der Bouillon ein schönes Häutchen an der Oberfläche bilden, das bald in kleinere Schuppen zerfällt, die dann zum Teil zu Boden sinken, während die Flüssigkeit im großen und ganzen klar bleibt und nur vereinzelte Bröckel aufweist, ist die Hautbildung in Bouillon, die mit altem Material beschickt ist, gegenüber der Ansammlung von Bacillen am Boden sehr geringfügig. Auf dem Glycerinagarstrich zeigt der Stamm A einen grauweißlichen, mattglänzenden Belag; Stamm B und C können in diesem Kulturverfahren nur schwer voneinander unterschieden werden: beide wachsen ziemlich üppig, der Rasen besitzt eine glänzende Oberfläche (B stärker als C) und in den unteren Partien gegen das Kondenswasser hin, tritt bald gelbliche Färbung auf, die bei beiden Stämmen mehr strohgelb ist. Ein deutlicher begünstigender Einfluß von Glycerinzusatz zum Agar auf das Wachstum konnte nicht beobachtet werden.

In der Bouillonkultur unterscheiden sich die Stämme 2 und 3 deutlich von dem oben beschriebenen Bilde des Stammes A dadurch, daß die Häutchenbildung fehlt. Die Bouillon wird von diesen beiden im Gegensatz zu der geringen Bröckelbildung (A) sehr bald — wenn auch in geringem Maße, aber doch gleichmäßig — getrübt. Diese Trübung verschwindet dann nach einigen Tagen unter Ansammlung eines sandigen, mehr oder weniger gelb gefärbten Bodensatzes.

Die Reaktion der Bouillonkultur ist beim Stamm A anfangs sauer, wird aber später wieder alkalisch, während sie bei den Stämmen B und C ganz schwach alkalisch ist.

In der Milch wachsen alle 3 Stämme bei 37° gut, bringen die Milch nicht zur Gerinnung bei neutraler Reaktion. Die gewachsene Bakterienmenge sammelt sich bei allen drei am Boden des Röhrchens und bildet bei B und C schon sehr bald die charakteristischen Farben, d. h. mehr wachsgelb bei B, mehr goldorange bei C, während bei A die anfangs graue Masse erst nach einigen Wochen einen leicht gelben Farbenschimmer annimmt. In Traubenzuckerbouillon tritt bei allen Stämmen keine Gasbildung auf; während auf Kartoffeln auch bei Brüttemperatur Stamm A und B überhaupt nicht, Stamm C nur äußerst schwach angehen, ist auf Gelatine bei sämtlichen Stämmen (22°) ein wenn auch sehr schwaches, so doch deutliches Wachstum erkennbar. Die Farbstoffbildung tritt nur bei Stamm 3 in geringem Grade auf. Ein proteolytisches Ferment wird nicht gebildet. Im Gelatinestich fanden wir bei A, B und C auf der Oberfläche ein kleines Knöpfchen, während im Stichkanal nur in den obersten Abschnitten Wachstum stattfindet.

Auch nach ihrem Verhalten im tiefen Traubenzuckeragarstich halten wir alle drei Diphtheroide für obligate Aërobier; sicher aber sind sie Philaërobier.

Der Gedanke, daß bei unseren 3 Stämmen ein ähnliches Verhalten vorliege, wie es bei dem *Staphylococcus aureus* von Neumann u. a. konstatiert wurde, daß nämlich bei Verarbeitung einer gelben Kolonie zu Platten nicht nur wieder gelbe Kolonien, sondern auch weiße auftreten, daß es sich also um Transformationsvorgänge handle, lag nahe.

Wir haben uns aber durch wiederholtes Plattengießen davon überzeugt, daß stets nur Kolonien des gleichen Typus erschienen. Auch war auf Serumplattenausstrichen die Erkennung des jeweilig vorliegenden Typus möglich.

Unseres Wissens ist in der Literatur über das Vorkommen von Corynebakterien im Entenauge nichts veröffentlicht. Die Säurebildung, welche eine Zeitlang als spezielle Eigentümlichkeit für die echten Diphtheriebacillen in Anspruch genommen worden war, mußte als diagnostisches Merkmal wieder fallen gelassen werden, nachdem die Beobachtungen, wie die Kurth'schen gezeigt hatten, daß es auch säurebildende Pseudodiphtheriestämme gibt. K. fand 3 Arten, die er mit dem Namen *B. pseudodiphtheriticus acidumfaciens* zu einer Gruppe zusammenfaßte. In diese Gruppe würde auch unser Typus A hineingehören.

Ueber farbstoffbildende Mitglieder der Diphtheriegruppe ist in der Literatur nur wenig bekannt. So machen Lehmann-Neumann die Angabe, daß sie oft in alten Agarkulturen von Pseudodiphtheriebacillen braunrote bis braunschwarze Verfärbung beobachtet haben. Daß es sich hierbei kaum um echte Farbstoffbildung gehandelt haben kann, geht aus der Bemerkung der genannten Autoren hervor, daß dieser Färbung auf Glycerinascitesagar bei einer Kultur nach 10—14 Tagen, bei drei anderen Stämmen noch später auftrat. Es liegt hier also eine mit Alterserscheinungen zusammenhängende Umfärbung nach der dunkleren Nuance hin vor.

Das ist ja eine Eigenschaft sehr vieler Bakterien; die wir auch bei unseren farbigen Pseudodiphtheriestämmen beobachtet haben. Was unsere Typen B und C von den Stämmen unterscheidet, welche L. und N. beschreiben, ist die Eigenschaft, von Anfang an echte Farbstoffbildung zu zeigen. In ähnlicher Weise, wie unsere Stämme, verhält sich nur eine Pseudodiphtheriekultur, welche von Honl in Prag stammt und die ebenfalls von L. und N. beschrieben wurde; diese zeigte auf allen Nährböden einen rötlichen Ton, der besonders intensiv (rosa) in der obersten Schicht einer Milchkultur zu finden war. Der Vollständigkeit halber sei hier das *B. diphth. avium* (Loir und Duclaux) erwähnt, der auf Kartoffeln üppig gelbweiß wächst. Dieses Bakterium hat seinen Namen aber nur von seiner Eigenschaft, pathologisch-anatomisch und klinisch diphtherieartige Krankheitserscheinungen bei den verschiedensten Vögeln hervorzurufen. Nach der Beschreibung, die wir bei Flügge und nach dessen Angaben im Matzuschita fanden, ist dieser Bacillus eigenbeweglich, nach Gram nicht färbbar und koagulierte die Milch. Es handelt sich selbstverständlich hierbei auch gar nicht um einen Diphtherie-(Coryne)bacillus.

Flügge führt ihn unter der Gruppe der hämorrhagischen Septikämie auf, übrigens, wie wir glauben, mit Unrecht. Die Richtigkeit der Zupnik'schen Beobachtung einer langsam eigenbeweglichen Gram-negativen, farbstoffbildenden angeblichen Varietät des Löffler'schen Bacillus¹⁾ ist von Sobernheim bestritten worden.

Auch wir zweifeln an der Richtigkeit der Klassifizierung.

Bei der außerordentlichen Seltenheit von stark säurebildenden unechten Diphtheriebacillen und der noch größeren Seltenheit von Pseudodiphtheriestämmen mit echter Farbstoffbildung glauben wir die Beschreibung unserer Stämme schon jetzt veröffentlichen zu sollen, obwohl unsere Untersuchungen über den Zusammenhang des bakteriologischen Befundes mit dem klinisch-anatomischen Bilde noch nicht abgeschlossen sind.

1) Zupnik, L., Ueber Variabilität der Diphtheriebacillen. (Berl. klin. Wchschr. 1897. No. 50. p. 1085.)

Da wir die drei verschiedenen Diphtheroïdarten von Bacillen¹ zunächst aus den Augen einer uns vom Gute Poklatki übersandten kranken Ente gezüchtet hatten, und alle drei Arten auch später noch bei einer zweiten kranken Ente wiederfanden, glaubten wir feststellen zu sollen, ob der graue und die beiden farbigen Pseudodiphtheriestämme auch bei gesunden Enten im Auge zu finden sind. Wir haben zu dem Zwecke auf dem Wochenmarkte zu Pudewitz die Augen von 10 Enten untersucht, die aus verschiedenen Beständen stammten.

Hierzu haben wir sterile Diphtherieabstrichröhrchen benutzt, indem wir den Tieren mit dem Wattebäuschchen die Tasche unter der Nickhaut auswischten. In Posen haben wir, wie bei der Diphtherieuntersuchung, Ausstriche auf Löffler-Serumplatten angelegt und dort, wo gefärbte Klatschpräparate uns das Vorhandensein von Diphtheroïden anzeigten, durch Plattengießen die Stämme herausgezüchtet. Bei 2 Enten fanden wir unseren grauen Pseudodiphtheriestamm wieder, bei einer Ente den hellgelben und den orangefarbenen Stamm.

In den Augen von 7 Enten fanden wir keine keilförmigen Bacillen. Es möge hier noch gesagt sein, daß die Augen der 3 Enten, welche Träger der beschriebenen Pseudodiphtherieformen waren, bei der Untersuchung völlig gesund aussahen.

Pseudodiphtheriebacillen sind sicher in der Natur noch viel stärker verbreitet, als man in der Literatur bisher annahm; aber das Vorkommen von gleich drei verschiedenen Formen, von denen zwei sich durch eine schöne Farbstoffbildung auszeichnen, in den Augen verhältnismäßig vieler Enten, gesunder und kranker, hat auch uns überrascht, trotzdem einer von uns sich zur Zeit mit der Frage des Vorkommens von diphtheroïden Bakterien besonders beschäftigt.

Eine besondere Frage ist es nun, inwieweit die geschilderten Bakterien in einem ursächlichen Zusammenhang mit der massenhaften Erkrankung der Enten steht, und ob sie überhaupt pathogene Eigenschaften besitzen, mögen sie nun septisch oder toxisch wirken.

Auch die Untersuchung der Fähigkeit, im Serum vorbehandelter Tiere spezifische Agglutinine zu bilden, muß noch erörtert werden.

Mit der experimentellen Feststellung dieser und noch einiger anderer Fragen sind wir zur Zeit noch beschäftigt.

Nachdruck verboten.

A disease of the rat caused by an acid-fast bacillus.

By George Dean, A.M., C.M., M.B.,

Bacteriologist-in-Charge, Serum Department, Jenner Institute of Preventive Medicine, London.

The disease affecting the skin, musculature, and glands of the rat (*Mus decumanus*) caused by an acid-fast bacillus described by W. K. Stefansky¹) at Odessa and Lydia Rabinowitsch²) at Berlin, is probably of wide distribution.

1) Stefansky, Eine lepraähnliche Erkrankung bei Wanderratten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. No. 7.)

2) Rabinowitsch, Ueber eine Hauterkrankung der Ratten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. No. 8.)

It was observed here and its nature recognised by me quite independently in February of this year. The Department here is situated on a small farm about 11 miles from London. In connection with certain work on plague the servants were instructed to destroy, or capture alive, as many rats as possible. At the end of February a rat was brought to me which had been found in a dying condition and killed.

The animal was emaciated and was suffering from an extensive affection of the skin. A great part of the skin of the thorax and abdomen was denuded of hair, and projecting above the surface of this bare area were several nodules the size of peas or beans. Near these nodules there were several small ulcerated areas. The axillary glands were enlarged. There were no visceral lesions present.

On cutting through the abdominal wall it was found to be greatly thickened; at one point reaching half an inch, and to have a cheese-like consistence.

I do not propose to enter on a full description of the histological appearances observed; they are almost identical with those described by Stefansky in his second form of the disease where the skin and muscle are chiefly involved (hautmuskuläre Form). At the point where the process had advanced furthest, near the ulcerated areas, there was a proliferation of the connective tissue elements, as well as infiltration of leucocytes, causing atrophy of the epithelial layer. The affected area of the abdominal wall was beset with small nodules with necrotic centres surrounded by leucocytes. There appeared rather more evidence of necrosis in this case than in those described by Stefansky. There was no evidence in the nodules of giant-cell formation but this was a marked feature in the lymphatic glands. The cell proliferation had extended between the muscular fibres, a great many of which had lost their striation and become atrophied.

The bacillus.

Practically the whole area involved was packed with acid-fast bacilli. In sections which had been stained with Carbol-Fuchsin (Ziehl-Neelsen) and treated several times with 25 % sulphuric acid, washed with water, treated with methylated spirit, and counterstained with Methylene Blue or Haematoxylin, the great bulk of the section was found stained with Fuchsin, and on minute examination this was seen to be due to the enormous number of the "acid-fast" bacilli present. The bacilli lay not only in the necrotic areas, but were present also in large numbers in the cells. Many of the cells were so tightly packed with the bacilli that only the nuclei were visible. The resemblance of some of the larger cells to "lepra-cells" as described by Stefansky is striking. This occupation of the granulation cells by the acid-fast bacilli is a very marked feature of the condition. It extends to those lying between the atrophic muscular fibres, and many of the fibres themselves are replaced by masses of bacilli.

The bacilli are on an average about 5μ in length; a few longer forms were observed. They have frequently the granular appearance found in the leprosy bacillus. No branching or clubshaped forms were found. In addition to being acid- and alcohol-fast the bacillus retains the colour when stained by Gram's method.

Cultivation. Attempts to cultivate the bacillus on the ordinary media failed.

Inoculation. Two white rats were inoculated on the 21st February. A pocket was made in the skin of the abdomen, and a particle, the size of a hemp seed, from the diseased area, was inserted into the pocket. Two months later the rats showed no signs of infection.

The disease, first described by Stefansky presents very distinct pathological characteristics. There can be little doubt that the acid-fast bacillus present is the pathogenic agent. As has been remarked by Rabinowitsch it is improbable that the bacillus is one of the "Mistbakteria" which has secondarily infected a previously existing lesion; if that were the case one would not expect to find any difficulty in obtaining pure cultures.

The condition is one of interest¹⁾ as being one of the very few diseases due to "acid-fast" bacilli which occur naturally in the animal body, as the glandular form might on superficial naked-eye examination be mistaken for plague, as the disease has a wide distribution since it has been described as occurring in Odessa, in Berlin, and now in England.

Elstree, Hertford, 5th 18th April 1903.

Nachdruck verboten.

Weitere Untersuchungen über die Kleinsche tierpathogene Hefe.

Von **E. Klein** in London.

Betreffs des von Dr. E. Cohn in Bd. XXXIII. 1903. No. 9 dieses Centralbl. unter obigem Titel erschienenen Aufsatzes erlaube ich mir, zu den verschiedenen von Dr. Cohn zitierten Autoren auch meine eigene ausführliche Arbeit hinzuzufügen. Vor mehr als 2 Jahren habe ich in dem Report of the medical officer of the Local Government Board (für 1900—1901) das Vorkommen von Granulomata in den mit der obigen Hefe infizierten Meerschweinchen (Hoden, Darm) so wie von mit der Hefe intravenös infizierten Kaninchen (Rückenmark, Spinalganglien) beschrieben und durch 12 Photogramme illustriert.

¹⁾ Since the above was written three other examples of the disease have been met with in the district. An interesting additional feature of resemblance to leprosy was observed in the fact that in certain rats the nasal secretion contained the acid-fast bacillus.

Nachdruck verboten.

Beobachtungen über die Entstehung von jungen Malaria-Parasiten aus älteren.

Von **Moritz Silberstein**, Schiffsarzt, Amsterdam.

(Fortsetzung und Schluß.)

Bevor wir indes zu den größeren Formen mit reichlichem Protoplasma übergehen, sei hier noch kurz auf Veränderungen hingewiesen, welche feine Ringformen zeigen, sobald sie zu Grunde gehen. Die Behauptung Plehns, daß viele dieser Formen frühzeitig zu Grunde gehen und sich nicht weiter entwickeln, ist sicherlich wahr. Als allgemeines Prinzip indessen entspricht es den Tatsachen, glaube ich, nicht. Dieser Untergang nun ist hier ein scheinbar spontaner, vielleicht durch ein Mißverhältnis zwischen der individuellen Lebensenergie vieler Parasiten und den reaktiven Kräften des Organismus bedingt. In manchen (nicht gerade zahlreichen) Fällen, findet man dieses Verhalten sehr ausgesprochen, in anderen wieder wird das kaum wahrgenommen. Stirbt ein Parasit ab, so wird zunächst seine protoplasmatische Substanz betroffen. Sie erscheint aufgelockert, die Ringform ist teilweise verschwunden, oft bestehen nur noch einzelne, von ihrem Chromatinkorn getrennte Trümmer. Solche abgestorbene protoplasmatische Substanz ist, wie oben gezeigt, mit der Romanowsky-Ziemanschen Methode deutlich zu erkennen. Die achromatische Zone, wo sie noch vorhanden ist, ist blendend weiß. Das Chromatinkorn widersteht am längsten und färbt sich noch schön rot, wenn das Protoplasma schon desorganisiert erscheint. Endlich stirbt es auch selbst ab, es färbt sich nunmehr düsterrot bis schwärzlich. Merkwürdigerweise scheinen solche absterbenden Parasiten beinahe stets mit dem Chromatinkorn voran nach der Peripherie des Blutkörperchens verschoben zu sein. Vielfach findet man den Parasiten, oder was von ihm übrig geblieben ist, neben dem Blutkörperchen, mit dem er allein noch durch sein Chromatinkorn verbunden ist. Es ist, als ob der absterbende Parasit durch Verlust seines Haftungsvermögens gleichsam von der Fläche des Blutkörperchens herabsinkt. Noch später trifft man nur noch schwärzliche, dem Rande des Blutkörperchens anklebende, runde Chromatinkörner. Das Chromatin zeigt bei diesen früh zu Grunde gehenden Formen keine Wucherungsvorgänge. In einem Falle von *Tertiana maligna* traten solche Formen erst nach Chiningaben auf und waren in der fieberfreien Periode, welche ca. 5 Tage dauerte, im Blute zu finden. Einen Tag vor dem Rezidiv sah man neben solchen abgestorbenen Formen wieder auf einmal einzelne typische Ringformen mit blaugefärbtem Protoplasma und rotem Korn. In einem anderen ähnlichen Falle, bei einem Javanen, traten viele absterbende und abgestorbene Formen schon vor der Chiningabe auf, so daß ein Abhängigkeitsverhältnis zwischen beiden Dingen nicht zu bestehen braucht. Ähnlich verhielt es sich bei einem Marinematrosen mit einem Rezidiv von tropischer Malaria, bei welchem einige Stunden vor der Apyrexie, gleichfalls vor irgend welcher Chiningabe, schon zahlreiche abgestorbene Formen im Blute vorhanden waren. Es soll aber schon hier hervorgehoben werden, daß man beim Absterben kleiner tropischer Ringformen in der Regel keinerlei strukturelle Veränderungen an ihren Blutkörperchen

wahrnimmt. Eine Ausnahme scheinen unter Umständen kleine, sphärenbildende Parasiten zu machen, die sich manchmal in dieser Beziehung wie Golgische Parasiten verhalten können.

Nach den Mitteilungen Plehns nun ist das gleichzeitige Zugrundegehen des Chromatins beim Zerfall des Parasiten keine Notwendigkeit, sondern, wie oben schon hingewiesen, soll es unter Umständen erhalten bleiben und selbst wieder der Ausgangspunkt eines neuen Parasiten werden. Meine eigenen Erfahrungen in dieser Hinsicht sind nun, wie weiter unten gezeigt werden soll, derartige, daß ich die Möglichkeit eines solchen Vorganges nicht einfach von der Hand weisen möchte. Vielfach begegnet man bei kleinen wie Golgischen Parasiten Beziehungen zwischen Korn und Parasitenkörper, die eine Deutung im Plehnschen Sinne nahelegen. Es bleibt aber immer der Zweifel, ob ein solches Korn, das scheinbar durch sein tinktorielles Verhalten sehr lebenskräftig erscheint, nicht noch nachträglich doch bald abstirbt, ohne zur Entwicklung eines jungen Parasiten die Elemente geliefert zu haben.

Die Erörterungen über das Zugrundegehen protoplasmaarmer tropischer Ringformen legen es nahe, die dabei vorhandenen Verhältnisse mit denen bei großen Parasiten zu vergleichen. Ich muß mich in dieser Beziehung auf Golgische beschränken. Es zeigt sich nun, daß ein Absterben von Parasiten, oft in großer Zahl, neben vielen intakt bleibenden gerade hier ein sehr häufiges Vorkommnis ist, und zwar betrifft es nicht allein protoplasmaarme jüngere, sondern vielfach auch protoplasmareiche erwachsene Formen und Sphären. Hier nun kann man einen Einblick gewinnen in die vermutliche Ursache, die unter Umständen, wenigstens bei Golgischen und ihnen verwandten Parasiten, ein Absterben derselben bedingen können. Diese besteht darin, daß der Parasit sein Nahrungsterrain, das Hämoglobin der Blutscheibe, aufgezehrt hat und nun keine Existenzmöglichkeit mehr besitzt. Es ist bekannt, daß Tertianparasiten eine sogenannte Tüpfelung der Blutscheibe bedingen. Diese Tüpfelung tritt am schönsten auf, wo das Hämoglobin ganz aufgezehrt ist. Dann sieht man von der ehemaligen Blutscheibe nur die den Zustand der Tüpfelung bedingenden Körner, die mit der Romanowskyschen Methode rötlich-violett erscheinen. Wahrscheinlich sind diese Körner der Ausdruck von Knotenpunkten des Stromanetzes des Blutkörperchens, an denen sich der Farbstoff niederschlägt. In dieser Körneransammlung, deren Anordnung noch durch den Kontur des Blutkörperchens bestimmt ist und in der von Hämoglobin oft keine Spur mehr vorhanden ist, liegt nun der abgestorbene Parasit oder seine Reste. Ist die desorganisierende Tätigkeit des Parasiten eine sehr intensive, so können schon mittlere Formen mit ganz wenig Protoplasma den eben beschriebenen Zustand des Blutkörperchens bedingen und so selbst mit absterben. Das Bild, welches ein solcher Parasit bietet, erinnert an die oben für die tropischen Ringe gegebene Darstellung. In vielen Fällen weist ein winziger, etwas granulierter, schwach gefärbter Rest auf den ehemaligen Parasiten hin, in anderen ist auch dieser verschwunden. Dagegen bleibt das Chromatin, im Anfange wenigstens, wie bei den tropischen Formen, stets erhalten. Später ist auch hier ein Absterben desselben, unter gleichzeitiger Aenderung des tinktoriellen Verhaltens, häufig wahrzunehmen. Aehnlich sind die Erscheinungen, wenn große Parasiten absterben. Auch hier löst sich die Verbindung mit dem Chromatin, das entweder als solitäres Korn, oder in Form mehrerer Stücke, oder eines Stäbchens etc. oft weit von den Trümmern des

Parasiten entfernt liegt. Ist vom Parasitenleibe gar nichts mehr zu sehen, dann kündigt seine frühere Existenz das Chromatin allein an, welches innerhalb des Stromas liegen bleibt.

Gehen Sphären unter denselben Umständen vor ihrer völligen Reife zu Grunde, dann verhalten sie sich ähnlich. Ihr Chromatin, oft der einzig übrig gebliebene Teil, ist deutlich aufgefasert.

Ist aber die Lebenstätigkeit des Parasiten eine weniger intensive, bleibt neben der Tüpfelung des Blutkörpers genügend Hämoglobin übrig, bis der Parasit seinen Reifezustand erreicht, dann allein kann es zur Bildung von Jugendformen kommen.

Es ergibt sich also, daß ein Zugrundegehen von Parasiten in oft erheblicher Zahl kein auf tropische Formen allein beschränktes Phänomen ist, daß kleine und große, an Protoplasma reiche und arme Formen unter geeigneten Verhältnissen davon betroffen werden können, daß also auch hier kein Unterschied zwischen kleinen und großen Parasiten besteht. Nur scheint der Untergang Golgischer und manchmal kleiner, ihnen verwandter, sphärenbildender Parasiten mit dem gleichzeitigen Zerfall des Blutkörpers verbunden oder durch ihn bedingt zu sein. Bei den eigentlichen tropischen Ringformen aber weist nichts, nicht einmal eine metachromatische Verfärbung, auf ein Leiden des Blutkörperchens hin. Wenn hierin ein Abweichen von dem Verhalten der Golgischen Formen vorhanden ist, so ist das eben ein Beweis dafür, daß noch andere Bedingungen wie die erörterten vorhanden sein können, welche ein Absterben von Parasiten bedingen. An der Hand obiger Ausführungen sind wir jetzt in der Lage, die Theorie Plehns zu beurteilen, nach welcher das Absterben der kleinen Tropenringe die Regel, und nach welcher die dabei sich bildenden Zerfallsprodukte im Verein mit denen des gleichfalls zerfallenden Blutkörperchens und nicht der kaum vorhandene Sporulationsvorgang es sei, die bei kleinen Parasiten den neuen Fieberanfall bedingen und wodurch dieser den Charakter eines einfachen Resorptionsfiebers erhalten soll. Wäre das wirklich die Regel, so wäre damit ein bedeutungsvoller Gegensatz zu dem Verhalten großer Parasiten gegeben, der um so fremdartiger klingt, wenn man dabei an die Unitätsbestrebungen Plehns denkt.

Die Plehnsche Theorie stützt sich nun auf zwei Momente: einmal das plötzliche Schwinden der kleinen Ringe aus der Zirkulation kurz vor einem neuen Anfall und zweitens das häufige Fehlen von Sporulationsformen selbst in inneren Organen.

Die erste Tatsache nun trifft durchaus nicht allgemein zu. Sehr häufig sieht man auch bei tropischen Parasiten in allen Stadien, auch kurz vor einem neuen Anfall, die Parasiten in der Zirkulation. Was aber das Fehlen der Sporulationsformen betrifft, so stehen hier wiederum Wahrnehmungen gegenüber, die das Gegenteil beweisen. Nun sollen aber die diesbezüglichen Erfahrungen Plehns nicht in Zweifel gezogen werden. Es folgt daraus nur, daß junge Parasitengenerationen nicht immer dem typischen Sporulationsprozeß ihren Ursprung danken. Wir haben diesen Umstand oben schon teilweise erörtert und soll derselbe sogleich noch weiter verfolgt werden.

Doch kehren wir zuvor noch zu der Frage des plötzlichen Schwundes der Parasiten aus der Zirkulation zurück. Derselbe soll sich so erklären, daß das Absterben und Zerfallen von Parasiten und Blutkörper gleichzeitig erfolge, sodaß von dem Vorgang selbst nichts wahrgenommen

werden könne, nur sein Endresultat, das Schwinden der Parasiten, trete in die Erscheinung.

Wenn man sich vergegenwärtigt, was soeben über das Absterben von kleinen und Golgischen Parasiten ausgeführt worden ist, so wird man den Eindruck gewonnen haben, daß es sich hierbei nicht um etwas Plötzliches, gleichsam um ein mit Blitzesschnelle eintretendes Phänomen handelt, wodurch ganze Parasitengenerationen mit ihrem Wirt auf einmal, sozusagen, aus dem Dasein weggefegt werden, sondern der Vorgang vollzieht sich allmählich im Laufe des Fiebers oder zwischen den Anfällen, bald an diesem, bald an jenem Parasiten und an anderen gar nicht. Auch entzieht er sich nicht geheimnisvoll den Blicken, sondern, in der freien Zirkulation stattfindend, gestattet er auch, das Verhalten der Blutkörperchen dabei zu studieren, wobei sich, wie nochmals hervorgehoben werden soll, zeigt, daß beim Zugrundegehen kleiner Ringformen die Blutkörper gewöhnlich intakt bleiben. Sie können sich also an der Bildung der Zerfallsprodukte gar nicht beteiligen.

Folgende kurz wiedergegebene Krankengeschichten sollen zur Stütze obiger Ausführungen dienen:

Ein Marinematrose, chronischer Malarialeidender, erkrankt mit Temperatur 39,5 im Indischen Ozean. Im Blute zahlreiche feine, kleine und mittelgroße Tropenringe, Chromatin einfaches Korn oder doppelt, auch stäbchenförmig oder einen größeren Abschnitt der Peripherie des Parasiten einnehmend. Solitäre Chromatinkörner mit Hof, dem Blutkörperchen aufliegend. Sehr viele Blutkörperchen mit basophilen Körnungen.

Acht Stunden später Temperatur 38,6. Meistens im Zerfall begriffene Ringe. Blutkörperchen dabei intakt. Solitäre Körner. Andere, aber spärliche, feine Formen mit intensiver Chromatinteilung. Einzelne intakte Ringe. Am folgenden Morgen fieberfrei. Zahlreiche Parasitenrümpfer. Auch viele freie und aufgequollene Parasiten. Einzelne intakte Ringe.

Abends Temperatursteigerung bis 37,8. Dann gesund.

An diesem Falle sieht man erstens, daß ein weitgehender Zerfall von Parasiten sich den Blicken des Beobachters nicht entzieht, daß er ferner sehr viele Stunden lang andauert, daß die Blutkörperchen dabei intakt erscheinen, daß endlich der Zerfall von Parasiten schon während des Fieberzustandes stattfinden kann und durchaus nicht in der Apyrexie kurz vor einem neuen Anfall einsetzt. Auch sollte man meinen, daß hier durch den weitgehenden Zerfall von Parasiten soviel Resorptionsstoffe angehäuft sind, daß ein folgender, mindestens gleich intensiver Anfall hätte eintreten müssen. Anstatt dessen erfolgte eine abendliche Temperatursteigerung von nur 37,8° C. Dieselbe ist genügend erklärt durch die geringe Anzahl der zeitlich noch vorhandenen Parasiten.

Der zweite Fall betrifft einen Soldaten der N. J. Armee mit kleinen sphärenbildenden Parasiten und Uebergangsformen zu großen (siehe darüber noch weiter unten). Seit 3 Tagen intermittierende kurze, aber mit hoher Temperatur einsetzende Fieberanfälle, beginnend um 11 Uhr vormittags. Patient kommt erst am 4. Tage in Behandlung.

1. Untersuchung: Temperatur 40,4. Kleine Ringformen mit kräftigem Korn. Mittlere, dünn gezeichnete Formen = $\frac{1}{8}$ - $\frac{1}{5}$, Blutkörpergröße mit ein oder mehreren Fortsätzen, auch Quersäden, die durch die achromatische Zone ziehen. Einige dieser Formen zeigen Chromatinwucherung und Teilung. Auffallend viele Blutkörperschatten. Kleine Sphären. Hin und wieder eine große in getüpfelten Blutkörperchen.

2. Untersuchung, 4 Stunden später. Temperatur 37,9. Mittlere

Formen ähnlich wie oben, auch hier manchmal Chromatin in Teilung. Andere Formen von ähnlichem Bau, aber reicher an Protoplasma. Die sie enthaltenden Blutkörper sind öfters getüpfelt, aber nicht vergrößert. Größere kleine Ringe, solitäre Chromatinkörner mit Hof. Sehr häufig solitäre Körner oder Stäbchen mit Spuren eines Parasiten oder ohne solche in stark getüpfelten, nicht vergrößerten Blutkörperchen. Größere protoplasmaarme, mit Fortsätzen versehene Ringformen oder maschenförmige Bildungen von $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ Blutkörperchen. Letzteres zeigt normale Dimensionen. Restkörperbildung bei mittleren, protoplasmaarmen Formen (die Bedeutung der Restkörperbildung soll weiter unten dargelegt werden). Kleine zerfallene Sphären in stark getüpfelten Blutkörperchen. Große Sphären. Einige große Golgische Parasiten. Blutkörperschatten.

3. Untersuchung, 8 Stunden später: Temperatur 37. Ganz ähnliche Befunde wie oben. Große Parasiten nicht vorhanden. Die meisten erreichen $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ Blutkörpergröße. Auch jetzt viele zerfallene Parasiten und Blutkörperschatten.

4. Untersuchung. Am folgenden Morgen Temperatur 36,6. Einzelne grobe kleine Ringe, eine Sporulationsform in stark getüpfelten, nicht vergrößerten Blutkörperchen. Sphären. Vielfach Parasiten im Zerfall. Restkörperbildung. Blutschatten. Mittags und abends Temperatur 37,3. Seitdem gesund. Chininbehandlung. Auch hier also tritt der Zerfall schon im Stadium des abnehmenden Fiebers ein. In der Apyrexie dauert derselbe fort. Die Zerfallsprodukte werden durch ein konkomittierendes Absterben vieler Blutkörper, was sich durch die zahlreichen Schatten kundgibt, noch erheblich vermehrt. Auch jetzt sind eigentlich alle Bedingungen für ein intensives Resorptionsfieber gegeben, trotzdem mittags um 12 Uhr nur eine Temperatursteigerung von 37,3° C.

Ganz ähnlich verhielt es sich in einem dritten, durch Golgische Parasiten bedingten Falle. Auch bei diesem, obwohl Zerfallsstoffe in großer Menge im Stadium des abnehmenden Fiebers und in der Apyrexie vorhanden waren, erfolgte eine nur kurze zweite Temperaturerhebung von 37,6° C.

Mit Absicht sind die obigen Fälle so ausgewählt worden, daß sie verschiedenen Parasitenarten entsprechen, um nämlich daran zu zeigen, daß trotzdem gleichartige Verhältnisse und keine trennenden Unterschiede mit Bezug auf ihr biologisches Verhalten im menschlichen Blute bestehen. Meiner Ansicht nach haben wir es bei sämtlichen Parasitenarten mit gleichen Schicksalsgestaltungen zu tun. Das will sagen: Viele Parasiten vollenden ihren Entwicklungszyklus nicht, indem sie früher oder später absterben, viele andere dagegen gelangen auf die eine oder andere Weise zur Reproduktion neuer Individuen, deren Schicksal sich ähnlich gestaltet wie das ihrer Eltern, wodurch in meist kurzer Zeit, vor allem durch therapeutische Eingriffe noch unterstützt, die Zahl der Parasiten so erheblich abnimmt, daß sie zeitweise unschädlich werden.

2. Größere Ringformen.

Ringformen mit reichlichem Protoplasma können, wie oben wahrscheinlich gemacht, aus feinsten Ringformen durch kontinuierliches Wachstum direkt hervorgehen. Jedoch ist dies nicht der einzige Weg. In zahlreichen Fällen kann man sich überzeugen, daß die größeren Formen schon in der Anlage, in ihren jüngsten Exemplaren als solche kennbar sind. Diese bestehen aus einem soliden Klümpchen Protoplasma und einem kräftigen Chromatinkorn. Eine achromatische Zone ist häufig in

diesem Stadium kaum zu erkennen oder nur schwach angedeutet. Sie entsteht erst auf einer etwas späteren Stufe der Entwicklung und damit auch die typische Ringform. Das sind nun auch die Formen, welche ihren Ursprung dem klassischen Sporulationsprozesse der Autoren verdanken. Ihre weitere Entwicklung führt sie wiederum diesem Sporulationsprozesse zu. Dabei wächst der protoplasmatische Teil, die achromatische Zone, nachdem sie ein gewisses Maximum ihrer Ausdehnung erreicht, nimmt unter der Massenzunahme des Protoplasmas wieder ab. Der Parasit ist jetzt beinahe kugelig oder in die Breite gezogen, einem soliden Cylinder ähnlich. Eine schwache achromatische Zone trennt ihn jetzt von dem gleichfalls vergrößerten oder in die Länge gezogenen Chromatinkorn. In diesem Stadium ist auch meist deutlich Pigment vorhanden. Die weiteren, zur Sporulation führenden Vorgänge entziehen sich in diesem Moment der Beobachtung im peripheren Blute, doch können sie in den inneren Organen weiter verfolgt werden. Dieser Entwicklungsgang war oft mit schöner Regelmäßigkeit vor allem bei Halbmonde bildenden kleinen Parasiten zu verfolgen.

Wo indes das Protoplasma nicht reichlich vorhanden ist, sieht man Zustände, welche an diejenigen bei größeren Ringformen mit wenig Protoplasma erinnern. So findet man mittlere Ringformen, bei denen die eine Hälfte des Ringes eine spindelförmige Verdickung zeigt, die andere ein rundes Korn. Die dazwischen liegenden Abschnitte sind ganz fein gezeichnet. In der weiteren Entwicklung vollzieht sich eine Verbindung zwischen Spindel und Korn, der Parasit nimmt an Masse zu und in einem Stadium, wo man die pigmentierten groben, vor der Sporulation stehenden Formen wahrnimmt, ist er als ein längliches, mit zwei Vakuolen versehenes Gebilde zu erkennen, das ca. $\frac{1}{3}$ Blutkörperchen einnimmt und dessen Chromatinteil stark stäbchenförmig in die Länge gezogen ist. Weiterhin zerfällt der Chromatinstab in 4—5 Teilstücke, während das Protoplasma, obwohl noch mehr gewuchert, keine Neigung zeigt, sich zu einem soliden Klumpen zu gestalten, sondern seinem Entstehungsmodus gemäß eine deutliche achromatische, durch einen mehr oder weniger entwickelten Protoplasmafaden in zwei Abschnitte zerlegte Zone aufweist. Auch zu maschenförmigen Bildungen, wie sie oben für die protoplasmaarmen größeren Ringformen beschrieben worden sind, kommt es häufig. Sie sind indes protoplasmareicher und enthalten gleichfalls 5—6 über ihre Oberfläche zerstreute Chromatinkörner. Es ist wohl kein Zweifel, daß solche Gebilde Teilungsformen repräsentieren, um so mehr, als man hier häufig auch feine Pigmentierungen wahrnimmt.

Auch begegnet man Formen, die ganz entschieden einer Verschmelzung zweier Parasiten gleichen. Zu beiden Seiten der Berührungsfäche sieht man dort, wo diese die Peripherie schneidet, je ein gut entwickeltes Chromatinkorn.

Eine sehr eigenartige Weise der Entstehung von jungen Parasiten aus älteren ist an erwachsenen protoplasmareichen sowie auch protoplasmaarmen Parasiten zu beobachten, die man, oberflächlich betrachtet, überhaupt nicht mit irgend einer Form der Sporulation vergleichen kann. Denn während bei einer solchen, wie sie auch beschaffen sein mag, das Endresultat die Bildung einer Vielheit von Individuen ist, kommt es hier nur zur Bildung eines einzigen. Ein großer Teil des Mutterparasiten, ja sein größter Teil, stirbt ab und bildet einen Restkörper, der gewöhnlich in mehrere, nicht selten pigmentierte Teilstücke zerfallen ist, die regellos an der Oberfläche des Blutkörpers liegen. Ein winziger, in der

unmittelbaren Nähe des Chromatinkorns gelegener Teil des Protoplasmas vereinigt sich mit diesem zu einem neuen Parasiten. Es ist dieser Prozeß gewissermaßen mit einer Verjüngung zu vergleichen. Auch an feinen Ringformen ist er zu beobachten. Der Restkörper oder seine Teilstücke sind in diesem Falle natürlich gering. Demgemäß bildet auch das Chromatinkorn mit dem übrig gebliebenen Teile des Parasitenleibes einen winzigen, kleinen Ring. Derartige feinste Ringe aber können sich auch von soliden, massigen Restkörpern abschnüren. Im allgemeinen jedoch sind die von bedeutenderen Restkörpern abstammenden Parasiten auch von größerem Bau. Unter diesen letzteren wandeln sich auch manche zu Sphären um und kann man junge, kleine Sphären, kennbar an ihrem massigen Protoplasma mit den schwarzen Pigmentstäbchen, der zentralen achromatischen Zone, in der das stark entwickelte, schon aufgefaserte Chromatin liegt, beobachten, neben Stücken des in der Nähe liegenden Restkörpers.

Von diesen Vorgängen kann man sich an geeigneten Präparaten auf das deutlichste überzeugen, besonders wiederum, wenn man sich der Romanowsky-Ziemannschen Methode bedient, welche Restkörper von lebendigen Teilen des Protoplasmas genau zu differenzieren gestattet. Auch hier kann es wiederum geschehen, daß der übrig gebliebene, lebendige Teil des Protoplasmas so klein ist, daß er sich färbereich nicht nachweisen läßt, und daß wir neben den Trümmern des Restkörpers nur ein kräftiges, solitäres Chromatinkorn finden. In solchen Fällen jedoch weist ein häufig zu konstatierender Hof um ein solches Korn auf eine nichtsdestoweniger bestehende Differenzierung hin.

Man würde meines Erachtens jedoch fehl gehen, wenn man alle solitären Chromatinkörner derart oder von dem bei kleinen Ringen beschriebenen überstürzten Teilungsprozeß herleiten wollte. Die Mehrzahl dieser Körner sieht man ja gerade im Beginne oder kurz vor Ausbruch des primären Fieberanfalles. Daraus ist zu entnehmen, daß sie gewöhnlich allerjüngsten Erstlingsformen entsprechen, von denen sie sich nur durch die minimale Menge ihres Protoplasmas unterscheiden, welches allein durch den hellen Hof um das Korn angedeutet ist.

Diese Entstehung eines neuen Parasiten durch Loslösung von einem Restkörper, der dem Untergange anheimfällt, ist ein Vorgang, der nicht allein auf gewisse tropische Parasiten beschränkt ist, denn in allen seinen Entwicklungen, selbst bis auf das solitäre Chromatinkorn, habe ich ihn auch bei großen Tertianparasiten gefunden. Ja bei letzteren befand sich das Chromatinkorn fern von seinem Restkörper.

Hier allerdings konnte man oft den Eindruck gewinnen, als ob diese Chromatinkörner nach dem Plehnschen Modus die lebensfähigen Ueberreste eines im übrigen ganz zu Grunde gegangenen Parasiten seien, obwohl vielfach in der Umgebung des Kornes oder der Körner kein Hof zu sehen war. Darauf aber muß man meines Erachtens ein großes Gewicht legen. Wo ein Hof vorhanden, da ist auch höchst wahrscheinlich ein vom Korn gesondertes Protoplasma anwesend, das eben durch diesen Hof angedeutet wird, und man kann verstehen, daß sich hier ein neuer Parasit bilden kann, da ja alle seine Grundelemente erhalten geblieben sind. Wo aber das Chromatinkorn, scharf begrenzt, ohne einen solchen Hof dem Blutkörperchen aufliegt, da ist sicherlich auch keine vom Kern gesonderte protoplasmatische Substanz vorhanden, und bleibt es vorläufig doch zweifelhaft, ob wir ein solches Korn, so lebenskräftig es auch durch sein tinktorielles Verhalten aussehen mag, mit einem von einem

Hofe umgebenen in seiner Bedeutung gleichstellen dürfen. Nicht unwahrscheinlich ist es, daß ein solches scharf umgrenztes Korn, ohne einen protoplasmatischen Restkörper, sei er auch noch so klein, noch nachträglich abstirbt und keinen neuen Parasiten bildet. Indessen hier sind noch weitere Untersuchungen nötig.

Doch kehren wir zur Betrachtung der Restkörperbildung zurück. Auf den ersten Blick scheint sie ein sehr ungewöhnlicher Vorgang zu sein, und lohnt es sicherlich die Mühe, das Wesen desselben zu ergründen und ihn womöglich auf bekannte Vorgänge zurückzuführen.

Wenn ich mir nun die Umstände vergegenwärtige, unter denen ich die mit Restkörperbildung einhergehende Entstehung junger Parasiten am häufigsten beobachtet habe, so trat diese gewöhnlich in der zweiten Hälfte des Fieberzustandes oder gegen das Ende desselben auf, zu einer Zeit, wo sich bereits therapeutische Indikationen für die Darreichung von Chinin eingestellt hatten. Es lag daher nahe, eine ungenügende Chininwirkung als Ursache zu betrachten. Das Chinin, als ein Protoplasmagift, schädigt in erster Linie den protoplasmatischen Körper des Parasiten, während das Chromatinkorn besser widersteht. Unter solchen Umständen kann es kommen, daß diejenigen Teile des Parasitenleibes, die in der unmittelbaren Nachbarschaft des Chromatinkorns gelegen sind, einen so starken nutritiven Einfluß von diesem erfahren, daß derselbe größer ist wie die schädigende Wirkung des Chinins. Die peripherischer gelegenen Teile des Parasitenkörpers dagegen, auf welche sich der nutritive Einfluß des Chromatinkorns nur in geringem Maße erstreckt, unterliegen der abtötenden Wirkung des Chinins und bilden den Restkörper. In mehreren Fällen von *Tertiania simplex*, sowie von sphärenbildenden kleinen Parasiten konnten diese Phänomene indes noch vor der Verabreichung des Chinins wahrgenommen werden. Daraus folgt, daß, wenn das Chinin überhaupt einen Einfluß auf diese Art der Entstehung junger Parasiten besitzt, derselbe jedenfalls kein spezifischer, sondern höchstens ein begünstigender ist. Es scheint dieser Vorgang der Restkörperbildung auf einer Art verminderter vitaler Energie der Parasiten zu beruhen, infolge deren sie im Reifezustande nicht mehr zu sporulieren vermögen, und so erklärt sich dann auch die Tatsache, daß solche Formen — wo sie auftreten — erst gegen das Ende des Fieberzustandes auftreten. Wir hätten hier also eine abortive Sporulation vor uns. Letztere Auffassung erhält eine wesentliche Stütze durch das Studium an Golgischen Parasiten, insofern aus ihm hervorgeht, daß die Restkörperbildung mit der Produktion eines einzigen Parasiten Uebergänge aufweist zu Reproduktionsvorgängen, welche zur Sporulation hinüberleiten. Es kommen für das Studium dieser Verhältnisse relativ protoplasmaarme erwachsene Golgische Parasiten in Betracht. Wir haben schon gesehen, daß es auch bei diesen zu großen, maschenförmigen Formen kommt. Während aber bei tropischen Parasiten die maschenförmigen Bildungen aus ganz wenig Protoplasma bestehen, kommt es hier, innerhalb des feinen Fadennetzes, noch zu stärkeren lokalen Anhäufungen von Protoplasma, wodurch sie sich zum Studium der einschlägigen Verhältnisse mehr eignen. Häufig nun kann man sehen, daß der junge Parasit sich innerhalb der starken Protoplasmaanhäufung bildet, wobei das Chromatin dieser unmittelbar anliegt oder in ihr eingebettet erscheint, ohne eine Spur von achromatischer Zone. Später schnürt sich der größte Teil des Parasitenleibes ab und liegt, nicht selten durch einen größeren Zwischenraum getrennt und in mehrere

Teilstücke zerfallen, neben dem jungen Parasiten, der durchaus und in jeder Hinsicht einer aus dem typischen Sporulationsprozeß hervorgegangenen Form gleicht, nämlich ein intensiv gefärbtes, oft etwas in die Länge gezogenes Chromatinkorn, eingebettet in einer kleinen runden Masse von Protoplasma. Wo aber die Verhältnisse günstig sind, sieht man selbst 3—4 Chromatinkörner in einer größeren Anhäufung von Protoplasma eingebettet. Dieses enthält auch Pigmentkörnchen. Der übrige Teil des Parasiten ist fein netzförmig gestaltet und zeigt durch seinen schwärzlichen Farbenton, daß er sich demnächst zu einem Restkörper umwandeln wird. Dann aber gleicht die massige Konzentration des pigmentführenden Protoplasmas mit den 3—4 in ihm eingebetteten Chromatinkörnern schon sehr vielen Bildern, die man bei der typischen Sporulation findet. So trifft man auch Blutkörperchen, die 3—4 junge Parasiten mit Spuren eines Restkörpers zwischen ihnen enthalten. Aus alledem geht wohl hervor, daß man im Rechte ist, wenn man die Entstehung von Parasiten mit Restkörperbildung als eine abortive Sporulation auffaßt.

In besonders schöner Weise trat die Restkörperbildung in einem Falle von *Tertiana simplex* auf, der hier mitgeteilt werden soll.

Patient erkrankt den 17. November 1902 um 8 Uhr morgens mit Frost, Temperatur 37,5.

Im Blute echte Sporulationsformen, etwas größer als ein Blutkörperchen. In einigen noch der Rand des Blutkörperchens als blasser, farbloser, ganz feine Pigmentkörnchen enthaltender Saum zu erkennen. In den meisten Pigment zentral konzentriert, in einigen liegt ein Pigmenthaufen in der Peripherie.

Grobe kleine Ringformen mit achromatischer Zone.

Runde oder eiförmige kleine Formen, protoplasmareich, in denen die achromatische Zone fehlt oder nur angedeutet ist. Chromatinkorn stark entwickelt.

Viele mittlere, schön gezeichnete Ringe, mit mäßig entwickeltem Protoplasma = $\frac{1}{8}$ Blutkörpergröße.

Andere von derselben Größe, aber etwas unregelmäßig gezeichnet. Ihr Protoplasma ist vielfach etwas aufgefaserter, durch die achromatische Zone ziehen häufig ein oder zwei Fäden.

Ringformen von $\frac{1}{8}$ Blutkörpergröße mit wenig Protoplasma. Vom Rande des Ringes geht hier häufig ein Fortsatz aus.

Sphären in getüpfelten, etwas vergrößerten Blutkörperchen. Multiple Körnungen in vielen Blutkörpern.

Den 17. November 1 Uhr mittags Temperatur 39.

Kleinste runde Formen mit reichlichem Protoplasma. Chromatin zentral, ohne achromatische Zone. Andere zeigen achromatische Zone, Chromatin peripherisch.

Ringformen = $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{5}$ Blutkörpergröße, protoplasmaarm, mit feinem Fortsatz. Oft ist dieser Fortsatz netzförmig verzweigt. Vielfach achromatische Zone durch einen Querfaden geteilt.

Größere Ringe mit gut entwickelter achromatischer Zone und kräftigem Chromatinkorn.

In den größeren Ringen häufig Tüpfelung der mäßig vergrößerten Blutkörper zu finden.

Den 17. November 8 Uhr abends fieberfrei.

Durch Querfädenbildung, Aussenden von Fortsätzen, Verbindungsfäden zwischen diesen, entstehen maschenförmig gestaltete Parasiten

mit stellenweise grober, stellenweise allerfeinster Protoplasmazeichnung. Chromatin hierbei in Wucherung oder in Teilung begriffen. Parasiten = $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Blutkörpergröße. Blutkörper stark getüpfelt und mäßig vergrößert. Häufig scheinen die Parasiten desorganisiert, in Teilstücke zerfallen, die ganz schwach gefärbt erscheinen. Chromatin dabei vielfach ganz isoliert oder mit einem kräftiger gefärbten kleinen Protoplasmaabschnitt einen Ring bildend.

Einige Male Doppelinfektion von Blutkörperchen. Diese alsdann stark vergrößert und getüpfelt.

Vielfach sind die Blutkörperchen derart affiziert, daß nur die die Tüpfelung bedingenden rötlichen Körner übrig bleiben, während das Hämoglobin zerstört ist. In diesen Trümmern schwach angedeutete Reste von Parasiten und Sphären. Auch hier ist das Chromatin gut erhalten.

Kleine protoplasmareiche Parasiten mit deutlicher achromatischer Zone und feinem Fortsatz in getüpfelten Blutkörperchen.

Den 18. November 7 Uhr morgens Temperatur 37,1.

Kleine, sehr protoplasmareiche Ringe in getüpfelten, etwas vergrößerten Blutkörperchen.

Vielfach kleine Formen von elliptischer Gestalt mit reichlichem Protoplasma. Achromatische Zone in einem der Pole, darin das kräftige Chromatinkorn.

Kleine, protoplasmareiche, runde oder eiförmige Parasiten, Chromatin peripherisch oder zentral, ohne oder mit kleiner achromatischer Zone. Neben diesen Parasiten enthalten die Blutkörperchen häufig deutliche Restkörper, die ein einziges oder mehrere Teilstücke präsentieren, meist dunkler gefärbt, körnig und oft pigmentiert sind. Sie stehen mit den Parasiten in keinem Zusammenhang.

Große maschenförmig gestaltete Parasiten mit stellenweise stärkerer Protoplasmaanhäufung, in welcher 2—3 Chromatinkörner eingebettet sind.

Ein maschenförmig gestalteter großer Parasit mit 5 Chromatinteilstücken, etwas pigmentiert.

Ein vergrößertes Blutkörperchen enthält 3 Parasiten, zwischen ihnen Restkörper. Dies repräsentiert gewissermaßen ein weiteres Entwicklungsstadium der vorhergehenden Form.

Restkörper mit einem einzigen Parasiten sind im Präparate vorherrschend.

Den 18. November 1 Uhr mittags Temperatur 38,3.

Kleine protoplasmareiche Parasiten ohne achromatische Zone.

Sphären.

Vielfach kleine Parasiten mit reichlichem Protoplasma. Chromatin in diesem eingebettet oder durch schmale achromatische Zone getrennt. Neben ihnen liegen mannigfach gestaltete Restkörper.

Feinste Ringformen mit kräftigem Chromatinkorn, daneben Restkörper.

Mittlere, protoplasmareiche, unregelmäßig gestaltete Formen.

Blutkörperchen vergrößert und getüpfelt.

Den 18. November 8 Uhr abends Temperatur 39.

Protoplasmareiche, mittelgroße Formen, ohne achromatische Zone, in mäßig vergrößerten, aber stark getüpfelten Blutkörperchen.

Blutkörperchen, deren Hämoglobin gänzlich aufgezehrt ist und die allein die den Tüpfelungen entsprechenden roten Körner zeigen, enthalten neben Stücken sehr blaßgefärbter protoplasmatischer Substanz 2—3 stark gefärbte, isolierte Chromatinkörner. Vielfach kleine, runde,

protoplasmareiche Formen mit meist zentralem Chromatin und geringer Restkörperbildung. Blutkörper stark getüpfelt und wenig vergrößert.

Den 19. November 7 Uhr morgens fieberfrei.

Zahlreiche aufgequollene und desorganisierte Parasiten in der Mehrzahl frei zwischen den Blutkörperchen.

Keine getüpfelten Blutkörper mehr zu sehen.

Wenige metachromatische Blutkörperchen.

Obiger Fall würde bei oberflächlicher Betrachtung als eine gewöhnliche *Tertiana duplicata* imponieren, wobei die zweite Generation um 24 Stunden in ihrer Entwicklung hinter der ersten zurücksteht. Einigermassen entspricht ihm auch der Parasitenbefund, indem zu Beginn des zweiten Fieberanfalles große Parasiten der ersten und kleinste Formen der zweiten Generation vorhanden zu sein scheinen. Indessen beherrscht dieses Verhältnis nicht den Zustand und gibt ihm nicht sein charakteristisches Gepräge. Denn die Mehrzahl der großen Formen ist in Chromatinteilung und Restkörperbildung begriffen, während die überwiegende Zahl der kleinen Parasiten durch Abschnürung von Restkörpern, deren Trümmer noch neben ihnen liegen, hervorgegangen sind. Es ist demnach anzunehmen, daß diese kleinen Formen einen hervorragenden Anteil an dem zweiten Fieberanfall nehmen und ihn mit bedingen. Daraus aber würde folgen, daß die erste Generation anstatt in 48 sich in 24 Stunden entwickelt habe und daß die abortive Sporulation, als welche wir die Restkörperbildung bezeichnet haben, nicht allein als ein unvollständiger, sondern auch als ein überstürzter Prozeß aufzufassen ist. Es wäre erwünscht, Fälle von *Tertiana duplicata* in dieser Hinsicht einer Prüfung zu unterziehen. Nicht unwahrscheinlich ist es, daß solche Verhältnisse mehr angetroffen werden dürften.

Weiterhin zeigt unser Fall das Bemerkenswerte, daß nur die erste Generation, welche den Ausbruch des durch einen Schüttelfrost eingeleiteten primären Anfalls veranlaßt hat, ihre Existenz der typischen Sporulation verdankt. Später waren keine Sporulationsformen mehr wahrzunehmen und erfolgte die Bildung junger Parasiten durch Abschnürung von einem Restkörper oder vielleicht von solitären Chromatinkörnern nach Zugrundegehen des ganzen Parasitenleibes (Typus *Plehn*). Auch trat, obwohl die Temperatur im zweiten Anfall ebenso hoch stieg wie im ersten, kein Schüttelfrost mehr auf. Da unser Fall bezüglich seines Verlaufes sich in nichts von anderen ähnlichen Fällen dieser Art unterscheidet, so ist auch hierin die Lehre von der *Tertiana duplicata* zu prüfen. Ja vielleicht hat die hier gemachte Erfahrung eine größere Tragweite und findet sich ähnliches auch bei anderen Fieberarten, womit zugleich auch das häufige Fehlen von Sporulationsvorgängen selbst in inneren Organen (*Plehn*) seine einfache Erklärung finden dürfte.

Es sei mir nun gestattet, die ausführliche Mitteilung des mikroskopischen Blutbefundes bei einem meiner am genauesten beobachteten und obigen Ausführungen zu Grunde gelegten Fälle zu geben.

Patient, ein europäischer Heizer, erkrankt zum erstenmal auf der Heimreise im Indischen Ozean. Auf der Küstenreise hatte er eine 8-tägige Chininprophylaxe mit 0,5 g Chinin. sulf. täglich durchgemacht. Auf der Heimreise gleichfalls einer solchen Behandlung unterworfen, erkrankt er am 4. Tage der Prophylaxe abends 8 Uhr mit Gefühl von Kälte und heftigen Kopfschmerzen. Es folgte nun ein Fieber, welches erst staffelförmig anstieg, bis es nach ca. 45 Stunden sein Maximum erreichte

(40,7° C). Darauf fiel es in weiteren 24 Stunden bis 37,5°. Hieran schloß sich ein 44 Stunden dauernder Zustand schwankender Temperaturverhältnisse, währenddessen zweimal in 24 Stunden die Temperatur die normale überschritt und wieder unter die normale fiel.

Den 1. September 8 Uhr morgens, 12 Stunden nach dem Fieberanfall, erste Blutuntersuchung:

Vereinzelte, aller kleinste, sehr fein gezeichnete Ringformen mit winzigem Chromatinkorn. Solitäre Chromatinkörner vielfach mit Hof.

Viele regelmäßige protoplasmareiche Ringformen von ca. $\frac{1}{8}$ Blutkörpergröße. Chromatinkorn im schmalen Teile des Ringes gelegen. Blutkörperchen mit multiplen basophilen Körnungen sind hin und wieder vorhanden. Temperatur 38,3°.

Den 1. September 1 Uhr mittags Temperatur 39,4.

Allerfeinste, oft randständige Formen. Zahlreiche, schöne, protoplasmareiche Ringformen ca. $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{5}$ Blutkörpergröße. Chromatinkorn vergrößert, vielfach hakenförmig gestaltet und öfters innerhalb der achromatischen Zone gelegen, indes mehr gegen den schmalen Abschnitt der Ringfigur hin gerichtet. Andere Parasiten von länglicher Gestalt erreichen ca. $\frac{1}{4}$ Blutkörpergröße. Sie haben eine durch einen Protoplasmafaden in zwei Abschnitte geteilte achromatische Zone. Ihr Chromatin ist stark stäbchenförmig ausgezogen.

Den 1. September 4 Uhr mittags Temperatur 38,6.

Einzelne sehr feine kleinste Ringformen, auch randständig. Solitäre Körner.

Mittlere Ringe ca. $\frac{1}{8}$ der Blutkörperchen mit mäßiger Protoplasmaentwicklung. Große Parasiten mit reichlichem Protoplasma ca. $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ Blutkörpergröße. Chromatin häufig gewuchert, achromatische Zone deutlich, aber Ringform unregelmäßig oder modifiziert.

Den 1. September 8 Uhr abends Temperatur 39,9.

Ueberwiegend feinste kleine Ringe. Auch gröbere kleine Ringformen vorhanden. Solitäre Körner.

Spärliche mittlere und größere protoplasmareiche Parasiten von $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{3}$ Blutkörpergröße.

Den 1. Oktober 1 Uhr nachts Temperatur 39,3.

Präparat nicht gelungen, jedoch einzelne gröbere Ringe von mittlerer Größe gut erkennbar.

Den 1. Oktober 5 Uhr morgens Temperatur 39,4.

Auch dieses Präparat nicht gelungen. Mittlere Formen, keine größeren erkennbar.

Den 1. Oktober 1 Uhr mittags Temperatur 39,7.

Viele randständige allerfeinste Formen. Solitäre Körner.

Kleine Formen mit sehr wenig Protoplasma. Vielfach Ringform dabei erhalten. Vielfach aber dieselbe zerrissen. Das Protoplasma erscheint dann häufig fadenförmig, an einem oder beiden Enden dem Chromatin anhängend, geknickt oder wellig gestaltet. Chromatin dabei in lebhaftester Wucherung und Spaltung begriffen. Oft ist diese Wucherung und Spaltung so intensiv, daß nur minimale Andeutungen des protoplasmatischen Teiles vorhanden sind.

Den 1. Oktober 5 Uhr nachmittags Temperatur 40,7.

Zustand derselbe, womöglich noch ausgesprochener.

Den 1. November 9 Uhr morgens Temperatur 38,2.

Allerfeinste kleine Formen, größtenteils mit starker Chromatin-

wucherung und Teilung. Solitäre Körner. Hin und wieder eine etwas größere, protoplasmareiche Form.

Den 1. November 1 Uhr mittags Temperatur 38,2.

Spärliche kleine Parasiten, wie oben. Seitdem trotz noch bestehender Temperaturschwankungen Parasitenbefund negativ.

Uebersichtlich wir aufmerksam die Resultate der Blutuntersuchung, so kann man mit ziemlicher Sicherheit eine Generation von Parasiten unterscheiden, die ihren Entwicklungszyklus in 24 Stunden zu vollziehen scheint. Daneben aber sind in demselben Zeitraum auch Parasiten in den verschiedensten Stadien der Entwicklung vorhanden. Später findet man nur kleinere und mittlere Formen bis etwa zur 40. Stunde. Von da an aber, vom 1. Oktober 1 Uhr mittags bis 1. November 1 Uhr mittags finden sich nur kleine Formen mit sehr spärlichem Protoplasma und lebhafter Chromatinteilung. Daraus darf man wohl schließen, daß es von der 40. Stunde an nicht mehr zum Auswachsen der Parasiten kam, sondern daß sie sich in überstürzter Weise, kaum entstanden, immer wieder bis zum Erlöschen des Fiebers teilten.

Ferner ist wohl unzweifelhaft, daß die Parasiten, was ihre Zugehörigkeit, ihren Ort im System betrifft, den kleinen Parasiten zugerechnet werden müssen. Selbst in ihren größten Exemplaren erreichten sie durchschnittlich nur $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$ Blutkörpergröße.

Nachdem unser Patient noch eine Zeit lang nach Erlöschen seines Fiebers täglich mit $\frac{1}{2}$ g Chinin, später ungefähr eine Woche lang einen Tag um den anderen mit derselben Dosis behandelt worden war, erkrankt er am 18. Oktober 1902 an seinem ersten Rezidiv, vom Typus einer Febris intermittens quotidiana. Jedoch kam es nur zu zwei Anfällen.

Den 18. Oktober 4 Uhr mittags, 12 Stunden nach Beginn des Fiebers, erfolgte die erste Blutuntersuchung. Temperatur 40° C.

Zahlreiche kleine und kleinste sehr protoplasmaarme Formen.

Ebensolche mit viel Protoplasma. Bei manchen derselben ist keine achromatische Zone vorhanden. Solitäre Körner mit Hof einzeln oder zu zweien.

Mittlere feine und gröbere Ringe = $\frac{1}{8}$ Blutkörper. Basophile multiple Körnungen von Blutkörperchen.

Manche Blutkörper zeigen 2—5-fache Infektion und sind dann deutlich vergrößert.

Sphären in allen Stadien der Entwicklung: 1) Sphären in der Anlage. Sie bestehen aus einem Klümpchen Protoplasma mit schwärzlichem, stäbchenförmigem Pigment und starkem Chromatinkorn. 2) Junge Sphären, füllen ungefähr die Hälfte eines Blutkörpers, sind kugelförmig, zeigen das charakteristische stäbchenförmige Pigment, haben eine etwas peripherwärts verschobene achromatische Zone, innerhalb deren das kräftige, schon aufgefaserte Chromatin. 3) In erwachsenen Sphären liegt das kräftig gefärbte, zerfaserte Chromatin an der Peripherie. Protoplasmaleib ebenfalls kräftig gefärbt. Neben vielen schwärzlichen Pigmentstäbchen ist auch einiges gelbes Pigment vorhanden. Achromatische Zone fehlt. Doch trifft man auch Sphären, die, obwohl die Größenverhältnisse erwachsener aufweisend, ganz wie junge gebaut sind, nur ist die achromatische Zone genau zentral. Die erwachsenen Sphären überschreiten nicht die Größe eines Blutkörperchens, vielfach sind sie selbst kleiner, im Gegensatz zu denjenigen Gologischer Parasiten, die viel größer sind. 4) Alte Sphären. Ihr Protoplasmaleib färbt sich nur blaß. Ihr Chromatin, gleichfalls nur schwach gefärbt, manchmal kaum ange-

deutet, aufgefasert, liegt in einer großen achromatischen Zone oder Vakuole. Im weiteren Verlaufe treten 2—3 Vakuolen auf, zuletzt zerfällt die Sphäre in 3—4 blasse, unregelmäßig pigmentierte Teilstücke, während das Chromatin nur angedeutet oder verschwunden ist.

Den 18. Oktober 9 Uhr abends Temperatur 37,5.

Kleine protoplasmareiche Ringformen. Größere Ringformen ca. $\frac{1}{4}$ Blutkörpergröße.

Ebensolche Ringformen mit sehr wenig Protoplasma. Unter diesen sind viele mit einem feinen Protoplasmafortsatz versehen. Andere weisen an ihrem ganzen Umfange außer dem Hauptfortsatz noch kleinere Nebenfortsätze auf. Bei anderen verästelt sich ein Hauptfortsatz und durch quere Verbindung der gabelförmigen Zweigstücke entsteht ein feines Maschenwerk. In vielen Fällen zieht ein Protoplasmafaden quer durch die achromatische Zone einer feinen Ringform und teilt sie in zwei ungleiche Abschnitte.

Große, maschenförmig gestaltete, ein vergrößertes Blutkörperchen beinahe ganz ausfüllende Parasiten mit 5—6 an ihrer Oberfläche verteilten Chromatinkörnern.

Den 19. Oktober 7 Uhr morgens Temperatur 36,5.

Beinahe ausschließlich Blutkörperchen, welche neben kleinen feinsten Ringformen Restkörper enthalten, kennbar an ihrer schwärzlichen Färbung und daran, daß sie in keinem Zusammenhange mit dem Parasiten stehen, sondern oft weit von ihm abgelegen und aus mehreren Teilstücken bestehend erscheinen.

Den 19. Oktober 12 Uhr mittags Temperatur 37,2.

Wieder Parasiten mit Restkörpern, aber Parasiten etwas größer und protoplasmareicher als um 7 Uhr.

Sphären.

Große maschenförmige Parasiten in vergrößerten Blutkörperchen.

Nachts Temperatur 33.

Den 20. Oktober 7 Uhr morgens Temperatur 37,2.

Blutbefund ähnlich, wie bei der vorhergehenden Untersuchung. Parasiten spärlich. Blutkörper mit basophilen Körnungen. Viele Blutkörperchen mit anklebendem schwärzlichem Chromatinkorn.

Gehen wir nun zu einer kritischen Betrachtung des Blutbefundes dieses Rezidivs über. Wir finden dabei bei einem Vergleiche mit der primären Erkrankung einige sehr in die Augen fallende Unterschiede. Zunächst die Sphären. Sie waren im primären Anfälle überhaupt nicht vorhanden. Das ist aber kein Wunder, denn die Sphären, wie die ihnen biologisch gleichwertigen Halbmonde, kommen bei einem Erstlingsfieber nicht vor. Sie finden sich erst nach einiger Zeit und ist ihr Auftreten zugleich mit einem Wiederausbruch des Fiebers verbunden. Bei Halbmonden konnte ich ihr Erscheinen im Mittel am 10. Tage beobachten. Auch Sphären zeigen ein ähnliches Verhalten. Allerdings hat es hier ca. 6 Wochen gedauert, bis sie zugleich mit dem ersten Rezidiv an den Tag kamen. Ihre Kleinheit — sie erreichten höchstens die Größe eines Blutkörpers — unterschied sie von denjenigen bei Golgischen Parasiten und gestattete zugleich, die Einreihung unserer Parasiten, die wir aus der primären Erkrankung schon als kleine kennen gelernt hatten, in die Klasse der sphärenbildenden kleinen zu machen. Dagegen stimmten sie morphologisch mit großen Sphären völlig überein.

Ein zweiter Unterschied besteht darin, daß die frühere, überstürzte Teilung der kleinen und mittleren protoplasmaarmen Ringformen im

Rezidiv nicht mehr auftritt. Im Gegenteil finden wir jetzt Entwicklungsformen, die einen langsameren und weniger intensiven Modus andeuten. Die Ringformen wachsen zu $\frac{1}{4}$ Blutkörperchen heran und wandeln sich durch Aussendung von Fortsätzen zu maschigen Bildungen um, unter gleichzeitiger Teilung des Chromatins. Die vorherrschende Vermehrungsform aber ist die, daß die Ringe, feine oder gröbere, nachdem sie eine gewisse Größe erreicht, zur Restkörperbildung übergehen, ein Vorgang, dessen Bedeutung als abortive Sporulation infolge verminderter Vitalität wir oben wahrscheinlich zu machen gesucht haben. Alles das finden wir bei Golgischen Parasiten auch, so daß, abgesehen von der Kleinheit unserer Parasitenform, die beobachteten Eigenschaften derselben auf eine innere Verwandtschaft hindeuten. Demnach geht es nicht an, um es noch einmal zu wiederholen, zwischen kleinen Parasiten und großen Tertianparasiten eine so scharfe Grenze zu ziehen, wie es Plehn tut, der doch an einer anderen Stelle seiner Monographie als Vertreter der Unitätstheorie der Malariaparasiten auftritt.

Was nun letztere Theorie betrifft, so liefert unser erstes Rezidiv noch keine entscheidenden Tatsachen. Allerdings finden sich vereinzelt maschenförmige Parasiten, die in ihren Dimensionen ihre Genossen weit übertreffen, in vergrößerten Blutkörperchen liegen und kaum von Golgischen Parasiten in demselben Stadium zu unterscheiden sind. Dagegen bieten sie niemals die Erscheinung der Tüpfelung, ein für die Diagnose echter großer Tertianparasiten sehr wichtiges Moment. Der einzige Schluß, zu dem wir auf Grund einer Analyse des Blutbefundes in unserem ersten Rezidiv vorläufig berechtigt sind, ist der, daß kleine, sphärenbildende Parasiten ein gewisses Variabilitätsvermögen besitzen, infolgedessen es geschehen kann, daß einzelne Parasiten sich zu großen Formen umwandeln. Ähnliches hat Plehn für afrikanische kleine Parasiten beobachtet, und zwar vorwiegend bei Individuen, die nicht mit Chinin behandelt worden waren. Diese Aetiologie aber kann in unserem Falle nicht angeführt werden, da er reichlich genug Chinin erhalten hat. Richtiger ist es vielleicht, dieses Phänomen auf inhärente Eigenschaften gewisser kleiner sphärenbildender Parasiten zurückzuführen, unabhängig von irgend einer medikamentösen Behandlung. Die Entwicklungsweise dieser kleinen Formen hat uns schon eine völlige Uebereinstimmung mit gewissen Formen Golgischer Parasiten gezeigt, woraus wir auf eine bestehende Verwandtschaft beider geschlossen haben. Das Studium des zweiten Rezidivs unseres Patienten jedoch, wovon der Blutbefund so gleich gegeben werden soll, wirft ein solches Licht auf die hier herrschenden Verhältnisse, daß es den Wert eines Beweises im Sinne der von Plehn, Laveran u. a. verteidigten Unitätstheorie erreicht.

Den 16. November 1902 12 Uhr mittags. Patient meldet sich erst 16 Stunden nach Ausbruch seines Fiebers. Im Blute viele protoplasma-reiche kleine Ringformen.

Große gröbere Ringe $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$ Blutkörpergröße. Ebensolche sehr feine, protoplasmaarme Ringe, achromatische Zone durch ein oder zwei Querfäden in Abschnitte zerlegt.

Ebensolche Ringe mit längerem feinem Fortsatz. Vielfach ist letzterer so verästelt, daß er ein maschenförmiges Gebilde darstellt, das mit dem Ringe durch einen Stiel zusammenhängt.

Viele kleinste Formen mit Restkörpern. Größere maschenförmige Bildungen = $\frac{1}{3}$ Blutkörpergröße, mit stärkerer Ansammlung von Proto-

plasma in der Umgebung des Chromatins, welches in dem Protoplasma eingebettet erscheint.

Den 16. November 4 Uhr mittags.

Kleinste feine und größere Ringe. Größere Ringe, die sich wie die oben beschriebenen protoplasmaarmen verhalten. Kleine Parasiten mit Restkörper.

Große Parasiten = $\frac{1}{2}$ Blutkörpergröße, Blutkörper vergrößert. Protoplasma maschenförmig, mit stärkerer Anhäufung in der Gegend des Chromatins, das in mehrere Teilstücke zerfallen ist.

Mehrfache Infektion eines Blutkörperchens durch kleine, protoplasmareiche Parasiten. Blutkörperchen vergrößert und getüpfelt.

Sphäre, ein vergrößertes und getüpfeltes Blutkörperchen zur Hälfte füllend. Große Sphäre, Blutkörperchen vergrößert und getüpfelt.

Den 16. November 8 Uhr abends.

Mehrzahl der Ringformen = $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{8}$ Blutkörpergröße, feine und größere Zeichnung. Ihr Verhalten wie oben.

Maschenförmige Parasiten = $\frac{1}{2}$ vergrößertes Blutkörperchen. Chromatin bis in 5 Teilstücke zerfallen.

Sphäre in getüpfeltem Blutkörperchen. Feine kleine Ringe mit Restkörpern.

Ringformen an ihrem dem Chromatin gegenüberliegenden Teile stark verdickt, oft geht von dieser Stelle noch ein langer, dicker Fortsatz aus, welcher etwas pigmentiert ist. Größe = $\frac{1}{2}$ Blutkörperchen.

Den 17. November 8 Uhr morgens.

Vielfach kleine Parasiten mit Restkörper. Maschenförmige Parasiten = $\frac{1}{2}$ Blutkörperchen mit stellenweise stärkerer Protoplasmaanhäufung. Chromatin gewuchert oder in Teilstücke zerfallen. Protoplasma vielfach fein pigmentiert. Blutkörperchen manchmal vergrößert und getüpfelt.

Kleine Formen, protoplasmareich, mit oft pigmentiertem Restkörper. Chromatin zentral. Blutkörper vergrößert und getüpfelt.

Wir sehen also, daß unser Fall, den wir von seinem ersten Beginne haben verfolgen können, im Anfange nur kleine Parasitenformen erkennen ließ, daß schon im ersten Rezidiv sich größere, an Goltgische Parasiten erinnernde Formen fanden, und daß der Parasitenbefund im zweiten Rezidiv schon Goltgischen Parasiten näher steht wie den kleinen, von welchen sie ausgegangen.

In der Tat finden sich vielfach ziemlich große Formen in vergrößerten und getüpfelten Blutkörperchen, so daß, wer den Patienten nicht gekannt und dieses zweite Rezidiv allein beobachtet hätte, auf den Gedanken hätte kommen müssen, es hier mit einem Falle von Tertian simplex zu tun zu haben.

Wir sind demnach auf Grund dieser Erfahrung berechtigt, anzunehmen, daß kleine sphärenbildende tropische Formen im Laufe der Zeit in Goltgische Formen übergehen können, und daß für diese wenigstens die unitarische Auffassung einiger Malariaautoren (Plehn, Laveran) zu Recht besteht.

Fassen wir zum Schlusse die obigen Ausführungen zusammen, so ergibt sich:

1) Protoplasmaarme Ringformen sind häufig keine kurzstündigen Gebilde, sondern zeigen vielfach eine intensive, auf ihre Reproduktion gerichtete Vitalität.

2) Protoplasmaarme Ringformen findet man nicht allein bei tropischen kleinen, sondern auch bei Golgischen Formen und es besteht in ihrem Verhalten bezüglich ihrer Weiterentwicklung meist kein prinzipieller Unterschied.

3) Protoplasmaarme Parasiten können sich zu protoplasmareichen umwandeln und verhalten sich dann wie diese. (cf. 4.) Bleiben sie protoplasmaarm, so teilen sie sich in einer von der normalen Sporulation abweichenden Weise. Und zwar unterscheidet man die überstürzte Teilung junger und die spätere Teilung älterer Formen. In dem ersten Falle nimmt das Protoplasma, entsprechend seiner geringen Menge und der Schnelligkeit des Teilungsprozesses, keinen aktiven Anteil an dem damit verbundenen Wucherungs- und Spaltungsprozesse des Chromatins. Dagegen erhält jedes der Teilstücke des Chromatins den seinen, wenn auch sehr geringen Anteil an protoplasmatischer Substanz. Oft ist dieser so gering, daß man es scheinbar nur mit einem solitären Chromatinkorn zu tun hat, das aber in solchen Fällen von einem Hofe umgeben ist. Im zweiten Falle sind die Verhältnisse dieselben, sobald das Protoplasma arm bleibt. Nimmt es aber an Masse zu, so bekommt es auch seinen Anteil am Teilungsprozesse. Es kommt dann zu maschenförmigen Bildungen bei gleichzeitigem Zerfall des Chromatins in Teilstücke. Vielfach kommt es hier zur Restkörperbildung und zur Bildung solitärer Körner.

4) Grobe Ringformen kommen zur typischen Sporulation oder sie wachsen gleichfalls zu maschenförmigen Bildungen aus, die sich wie sub 3 verhalten. Vielfach kommt es zur Restkörperbildung.

5) Die Restkörperbildung ist ein sehr verbreiteter Vorgang und als abortive Sporulation aufzufassen. Sie findet sich bei kleinen sphärenbildenden wie bei großen Tertianparasiten.

6) Vielfach haben Ringformen nur ein kurzes Dasein. Sterben sie ab, so stirbt gewöhnlich auch ihr Chromatin. Unter Umständen soll dieses jedoch erhalten bleiben und der Ausgangspunkt eines neuen Parasiten werden (Plehn). Da aber ein solches Chromatinkorn keinen Hof besitzt, so ist es noch eine Frage, ob es nicht noch nachträglich abstirbt, ohne einen Parasiten geliefert zu haben.

7) Solitäre Chromatinkörner mit einem Hofe können bei allen Arten der Teilung entstehen und zu jungen Parasiten auswachsen. Sehr häufig aber sind sie, da sie oft schon zu Anfang oder selbst vor Ausbruch des Erstlingsfiebers vorhanden sind, allerkleinsten Erstlingsformen gleichwertig.

8) Bei Tertianparasiten kommt es vor, daß nur die erste Generation durch typische Sporulation entsteht. Im weiteren Verlaufe entstehen junge Formen durch Abschnürung von einem Restkörper. Dabei kommt es in der Regel nur zur Bildung eines einzigen Parasiten. Möglicherweise ist hierin ein allgemeines Prinzip zu finden, welches auch andere Parasitenarten umfaßt.

9) Kleine sphärenbildende Parasiten können im Laufe einer relativ kurzen Zeit in große Golgische übergehen.

10) Das Absterben von tropischen Ringformen läßt in der Regel keine sichtbaren Veränderungen an den sie beherbergenden Blutkörperchen erkennen.

11) Die Hypothese, nach welcher ein neuer Malariaanfall bei tropischen Parasiten nicht durch den Sporulationsprozeß oder ihm verwandte Vorgänge, sondern durch einen massenhaften plötzlichen Zerfall von Parasiten und Blutkörperchen entstehen soll, scheint wenig wahrscheinlich.

Nachdruck verboten.

Studien über den Vaccineerreger. I.

Von Prof. H. Bonhoff, Marburg a. L.

Das Vierteljahrhundert der Entwicklung, welches hinter der bakteriologischen Wissenschaft liegt, hat die größten Errungenschaften gezeitigt. Es ist eine beträchtliche Anzahl von Erkrankungen des Menschen und der Tiere in ihren Ursachen genau erkannt worden. Auch über das Vorkommen und Verhalten der Mikroben dieser Infektionskrankheiten in unserer Umgebung, über die Art ihrer Wirkung im Körper, über die Einzelheiten des Kampfes zwischen Körper und Parasiten haben unsere Kenntnisse hervorragenden Zuwachs erfahren.

Gegenüber diesen großen Errungenschaften ist die Tatsache, daß wir über eine große Zahl von Infektionserregern so gut wie gar nichts wissen, von einer noch größeren Zahl wenigstens die Form nicht kennen, in auffallender Weise in den Hintergrund getreten.

Wenn wir uns in der menschlichen Pathologie zunächst umsehen, so sind als Infektionskrankheiten, deren Erreger wir nicht kennen, vor allem die akuten Exantheme und die Syphilis zu nennen. Eine weitere Gruppe umfaßt das große Gebiet der nicht durch Fadenpilze etc. bedingten infektiösen Hautkrankheiten. Als dritte Gruppe kommt in Betracht eine Anzahl von Krankheiten des Nervensystems, deren Charakter als Infektionen schon lange bekannt ist, vor allem die spinale und cerebrale Kinderlähmung und die Landrysche Paralyse; ferner die Arthrogryposis. An der Spitze einer vierten Gruppe, durch deren zusammenfassende Besprechung jedoch nichts präjudiziert werden soll, sei der Keuchhusten genannt. Dann die akute gelbe Leberatrophie, die primäre hypertrophische Lebercirrhose, die Leberabszesse der Tropen, soweit sie nicht durch Amöben bedingt sind, das Noma, der Mumps, die strumösen Erkrankungen, die Beri-Beri, die Schlafkrankheit der Tropen. Es bleiben eine ganze Anzahl von Erkrankungen des Menschen übrig, bei denen der Charakter als Infektionskrankheit zweifelhaft erscheinen kann; die sogenannten Konstitutionskrankheiten, ferner Rhachitis und Osteomalacie und manches andere.

Auch unter den tierischen Infektionen ist eine beträchtliche Anzahl solcher zu finden, über deren Ursachen wir nichts wissen. Ich nenne die Hundetaupe, die Rinderpest, die Lyssa, die ja auch auf den Menschen übergeht, die beiden verschiedenen Formen von Pocken bei Säugetieren, die Geflügelpocken, die afrikanische Pferdesterbe, die Stomatitis pustulosa contagiosa, die Beschälseuche der Pferde, den Bläschenausschlag des Pferdes und Rindes, das Petechialfieber (Morbus maculosus). Auch die Maul- und Klauenseuche des Rindes und Schweines, ferner die von Centanni und von Lode und Gruber beobachtete und als Kyanolophia bezeichnete Hühnerseuche gehören hierher.

Gerade unter diesen tierischen Infektionskrankheiten existiert nun aber eine Anzahl, über deren Erreger wir, wenigstens hinsichtlich ihrer Morphologie, in nächster Zeit Neues unter keinen Umständen werden zu erwarten haben. Dazu sind zu rechnen außer den beiden letztgenannten die südafrikanische Pferdesterbe und, wenn eine Mitteilung von Nicolle und Adil-Bey sich bestätigt, auch die Rinderpest.

Es gehören dazu ferner nach den Untersuchungen von Marx und Sticker die Geflügelpocken und nach Borrels Mitteilungen die Schafpocken. Bei diesen Krankheiten, ebenso wie bei einer Erkrankung der Tabakpflanze, der sogenannten Mosaikkrankheit, handelt es sich um Erreger, die jenseits der Sichtbarkeit liegen, also so klein sind, daß wir sie auch mit unseren besten Vergrößerungen nicht erkennen können. Es war mir eine Zeit lang wahrscheinlich, daß auch die Hundestaupe zu dieser Gruppe gehöre, da Infektionsversuche an Hunden, die vor Jahren mit den Reichelt- und Berkefeld-Filtraten von Staupe-sekreten geimpft waren, in zahlreichen Fällen positive Resultate ergeben hatten. Ich bin indes in dieser Auffassung wieder zweifelhaft geworden, da die Wiederholung der Versuche an Tieren, welche in einem niemals mit staupekranken Hunden belegten Stalle gehalten wurden, völlig negative Resultate ergeben hat. Wenn die letztgenannten Tiere nicht eine Immunität gegen Staupe besessen haben — was nicht ausgeschlossen ist, da es sich nicht um ganz junge Hunde und nicht um edlere Rassen handelte — so wäre das zuerst erhaltene Resultat als durch Stallinfektion hervorgerufen anzusehen.

In der menschlichen Pathologie sind durch unsichtbare Lebewesen bedingte Infektionen noch nicht festgestellt worden. Es ist aber bereits die Ansicht geäußert, daß ein Teil der in ihren Erregern unbekanntem menschlichen Infektionskrankheiten durch wegen ihrer Kleinheit unsichtbare Mikroben hervorgerufen sei. So sagt z. B. Metschnikoff in seinem Buche über Immunität p. 2: „In dieser Kleinheit gewisser Bakterien ist sehr wahrscheinlich der Grund zu suchen, weshalb es bisher nicht gelungen ist, die Erreger einer ziemlich großen Anzahl von Infektionskrankheiten zu finden, z. B. von Scharlach, Röteln . . . Pocken u. a. m.“ Es wird später Gelegenheit genug sein, auf diese Anschauung zurückzukommen. Hier genügt es, festzustellen, daß bisher der Beweis dafür nicht erbracht ist, daß eine der oben genannten menschlichen Infektionskrankheiten durch mikroskopisch unsichtbare Lebewesen bedingt werde.

Welch ein weites Feld zukünftiger Tätigkeit liegt vor uns! Fast könnte das Erreichte in seiner Größe und Mannigfaltigkeit beeinträchtigt erscheinen! Jedenfalls dürfte es angemessen sein, weniger daran zu denken, wie herrlich weit wirs gebracht, als an das Buch mit sieben Siegeln, das vor uns liegt.

Denn eine Aufklärung über die Ursachen der oben genannten Infektionskrankheiten hätte sowohl eine hohe theoretische als eine eminente praktische Bedeutung. Dies braucht eigentlich kaum des weiteren ausgeführt zu werden. Doch sei bezüglich der praktischen Bedeutung erwähnt, daß die Auffindung des Erregers der Pocken vielleicht auch Aufklärungen über die Masern- und Scharlacherreger zur Folge haben würde. Ähnliches ließe sich innerhalb der oben angeführten Krankheitsgruppen auch von einigen anderen Erregern erwarten. Ferner, wenn wir auch vielleicht hinsichtlich der Prophylaxe bei manchen Infektionen, wie z. B. den Pocken, der Lyssa, so Vollkommenes erreicht haben, daß die Sicherheit vor Erkrankung selbst durch genaueste Kenntnis der Parasiten kaum wird gesteigert werden können — bei anderen Erkrankungen fehlt uns doch bis heute auch jede primitivste Grundlage zu einer Vorbeugung, soweit sie nicht auf ganz allgemein anwendbaren Isolier- und Desinfektionsmaßregeln beruht. Auch hinsichtlich der Behandlung und Heilung dieser Erkrankungen dürfen wir

von genauerer Erkenntnis der Erreger, vielleicht wenigstens bei einigen derselben, günstige Erwartungen hegen. Und schließlich würde doch auch der Erweiterung unserer Kenntnisse über Immunität, die sich im Gefolge der Erkenntnis der fraglichen Parasiten zweifellos einstellen würde, eine praktische Bedeutung nicht abzusprechen sein.

Ehe ich meinen eigenen Untersuchungen näher trete, muß noch die Frage erörtert werden, ob nicht der dauernde Mißerfolg in der Aufindung der mutmaßlichen Mikroben vielleicht darin seinen Grund hat, daß körperliche Elemente, lebende, zellige Gebilde, eben gar nicht vorliegen, daß es sich bei der Aetiologie der betreffenden Erkrankungen um chemische Agentien, Enzyme z. B., handelt. Diese Auffassung ist neuerdings nicht allzuselten und zwar von verschiedenen Seiten ventilirt worden. Ich kann mich über diesen Punkt ganz kurz fassen. Zunächst ist meines Erachtens die Möglichkeit, daß Enzyme den Intoxikationserkrankungen ähnliche Krankheiten erzeugen könnten, nicht von der Hand zu weisen. Es ist auch möglich, daß solche Erkrankungen einmal en- oder epidemisch oder wenigstens in gehäufter Zahl auftreten können. Festzuhalten ist aber, daß ein Beispiel für etwas Derartiges bisher in der Pathologie nicht vorliegt. Im übrigen verweise ich hinsichtlich dieses Punktes einmal auf die Darstellungen Henles in seinen „pathologischen Untersuchungen“ aus dem Jahre 1840: „Wir treffen . . . zuerst auf eine allgemeine und charakteristische Eigenschaft, welche nur der lebenden Materie zugeschrieben werden kann, das Vermögen nämlich, sich auf Kosten und durch Assimilation fremder organischer Substanz zu multiplizieren“. Weiterhin empfehle ich ein genaues Studium der Untersuchungen von Loeffler und Frosch über die Maul- und Klauenseuche und eine im 31. Bande des Centralblattes für Bakteriologie und Parasitenkunde erschienene Arbeit von Ernst Joest über unbekanntes Infektionsstoffe, die die einschlägigen Fragen äußert klar und gründlich behandelt und in welcher der Verfasser auch hinsichtlich der meisten oben genannten Infektionskrankheiten schon auf Grund theoretischer Erwägungen zu dem Schlusse kommt, daß sie durch ein *Contagium vivum*, durch zellige Gebilde, erzeugt werden müssen.

Bei dem Bestreben, hinsichtlich der Aetiologie der oben aufgezählten zweifellosen Infektionen etwas weiter zu kommen, war die Auswahl des Materials, mit welchem die Versuche angestellt werden sollten, nicht ohne Bedeutung. Von vornherein auszuschließen waren zunächst diejenigen Erkrankungen des Menschen, die, auf Tiere überhaupt nicht übertragbar, eine spezifische Plage des Genus *humanum* darstellen. Von den übrig bleibenden Infektionskrankheiten sind zweifellos zwei am meisten zum Studium der unbekanntes Erreger geeignet und haben tatsächlich oft genug zu Untersuchungen gedient, weil einmal das Infektionsmaterial sich verhältnismäßig leicht beschaffen läßt und zweitens empfängliche Tiere in genügender Zahl zur Verfügung stehen: die *Lyssa* und die *Kuhpockenerkrankung*. Die *Lyssa* involviert immerhin bei der Verbreitung des Infektionsstoffes eine gewisse Gefahr für die Umgebung des Untersuchenden, die bei Arbeiten mit *Vaccine* nicht vorhanden ist. Mit letzterer schien also das geeignetste Versuchsobjekt gegeben zu sein.

Die eigenen Untersuchungen, über welche nunmehr berichtet werden soll, erstrecken sich über einen Zeitraum von mehreren Jahren, ein-

gerechnet die Zeit, die aus irgend welchen Gründen zum Arbeiten an dem Thema nicht benutzt wurde.

Zur Zeit des Beginns meiner Beschäftigung mit dem Gegenstand war bereits für die meisten Bakteriologen feststehend, daß es sich bei den Erregern der akuten Exantheme um Bakterien nicht handeln könne. Hatte doch eine tausendfach wiederholte Untersuchung, von den verschiedensten Autoren mit aller Gewähr der Genauigkeit und Zuverlässigkeit ausgeführt, immer dasselbe eindeutige Resultat ergeben: Kulturelle Sterilität der zur Uebertragung geeigneten Krankheitsprodukte, Unmöglichkeit, durch mikroskopische Untersuchung, Färbung etc. irgend etwas Spezifisches nachzuweisen. Sämtliche Methoden des kulturellen und mikroskopischen Bakteriennachweises, die bisher in irgend einem Falle von Erfolg gekrönt gewesen waren, hatten bereits Anwendung erfahren, die neuen zum Experiment herangezogenen Möglichkeiten waren nach jeder Richtung hin variiert und in größter Mannigfaltigkeit ausprobt worden.

Trotz alledem ließ sich damals für den, welcher anfang, sich mit dem Gegenstand zu beschäftigen, die Möglichkeit, daß sich ein pflanzlicher züchtbarer Mikroorganismus auffinden lasse, nicht von vornherein ganz von der Hand weisen. Als Warnung vor einem allzu schnellen Aufgeben der Hoffnung, auf dem angegebenen Wege das Ziel zu erreichen, mußte immer die Geschichte der Auffindung des Tuberkelbacillus dienen. Vielleicht war es doch nicht so ganz ausgeschlossen, durch tunlichst enge Anlehnung an die Bedingungen der Vermehrung im Körper, durch Benutzung möglichst frischen, noch „körperwarmen“ Aussaatmaterials, durch zahlreichste Variation der äußeren Verhältnisse, vor allem der Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse den Erfolg zu fassen. Auch die Tatsache, daß sich weder mikroskopisch noch kulturell etwas erreichen ließ, konnte zunächst an dieser Auffassung nichts ändern. Man hätte ja denken können, daß sich, wenn auch eine Züchtung unmöglich sei, doch mikroskopisch etwas müsse auffinden lassen, ebensogut wie z. B. in Rekurrenzfällen die mikroskopische Untersuchung des Blutes zur rechten Zeit den Krankheitserreger sofort aufdeckt, während seine Züchtung unmöglich ist; und wenn ich nicht irre, ist dieser Ansicht, daß man doch wenigstens mikroskopisch die eventuell vorhandenen Bakterien müsse nachweisen können, verschiedentlich, auch von autoritativer Seite Ausdruck verliehen worden. Aber wer hat vor dem Beginn der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts Tuberkelbacillen in tuberkulösen Drüsen oder ihrem Einschmelzungsprodukt gesehen? Oder wie viele Untersucher haben auch heute noch an der Impfstelle des Starrkrampfes bei Fällen ohne Mischinfektion Tetanusbazillen mikroskopisch nachgewiesen oder gar herausgezüchtet? Wenn es sich auch bei dem Inhalt der Vaccinepustel wahrscheinlich um weit zahlreichere Krankheitserreger als in den eben angeführten Beispielen handelt — der Mißerfolg hier konnte immerhin auch an einer Kleinigkeit, an der Nichterfüllung einer einzigen, vielleicht ganz nebensächlich erscheinenden oder einer bezw. mehrerer fundamentaler Bedingungen liegen.

Bei meinen Untersuchungen ist deshalb die Möglichkeit, eine Züchtungsmethode zu finden, niemals außer Acht gelassen und tatsächlich bis zum Frühjahr 1902 eine unzählige Menge von Einzelversuchen nach dieser Richtung ausgeführt worden. Was zunächst das Material betrifft, an welchem die Untersuchung vor sich ging, so handelt es sich

in der Hauptsache um frische menschliche oder Kälbervaccine. Daneben aber habe ich im Laufe der Zeit, von der festen Ueberzeugung durchdrungen, daß der Erreger der Variola im großen und ganzen identisch sein müsse mit dem der Vaccine, eine beträchtliche Zahl von Pockenkranken, bezw. deren Krankheitsprodukte in den verschiedensten Stadien des Pockenprozesses untersucht. Ferner sind im Laufe der Jahre fast alle mir zugänglichen Fälle von Scharlach, Masern und Syphilis und zwar deren Krankheitsprodukte, Rachenbelag, Bindehautsekret, Eiter der Geschwüre etc. und deren Blut zu verschiedenen Zeiten der Erkrankung teils zu Kontrollzwecken, teils aber auch, um vielleicht hier, wo, wie schon erwähnt, nach meiner und gewiß auch anderer Ansicht dasselbe Genus von Erregern vorliegt, einen Fingerzeig zu erhalten, einer genauen Prüfung unterzogen worden. Auch das Sputum keuchhustenkranter Kinder, so oft es rein erhältlich war, ferner die Krankheitsprodukte einiger in ihrer Aetiologie unaufgeklärter tierischer Infektionen, z. B. besonders der Hundestaupe, haben zu Kontrolluntersuchungen gedient.

Bezüglich des methodischen Vorgehens wurde bei allen Untersuchungen nach dieser Richtung der Hauptwert gelegt und die meiste Zeit verwendet auf die mikroskopische Durchsuchung des frischen Materials im natürlichen Zustande. Dabei wurde nicht nur mit Vergrößerungen bis 2250fach untersucht, sondern auch der Versuch gemacht, durch Aenderungen im Brechungszustande der Medien, Dinge, die eventuell wegen ihrer mit dem umgebenden Medium völlig gleichen Lichtbrechungsverhältnisse unsichtbar waren, für unser Auge sichtbar zu machen. Eine gesättigte Lävuloselösung diente zur Aenderung der Lichtbrechung, durch seitliche Beleuchtung und farbiges Licht wurde versucht, eine Verstärkung der Vergrößerung zu erreichen.

Gleichzeitig mit diesen Untersuchungen des Materials im natürlichen Zustande wurden selbstverständlich gefärbte Präparate von demselben Material hergestellt, mit so ziemlich allen Einzelfarben und allen Farbkombinationen, die bis zum Beginne der Arbeiten bekannt waren und im Laufe der letzten Jahre neu mitgeteilt worden sind. Auch war ich bemüht, durch neue, mir zweckmäßig erscheinende Zusammenstellungen der verschiedensten Farbreagentien meinem Ziele näher zu kommen.

Neben diesen histologischen Untersuchungen gingen stetig Versuche einher, durch möglichste Anpassung des Nährbodens an die natürlichen Verhältnisse eine Entwicklung des Krankheitserregers auf künstlichem Material zu erhalten. In frühester Zeit habe ich unter zahlreichen Fehlversuchen zu leiden gehabt und bin, wie andere auch, mancher Bakterienart näher getreten, die sich bei genauerer Untersuchung als gleichgültig erwies, weil die Vorbedingung für derartige Versuche, ein von fremden Bakterien freies, den Erreger aber in möglichster Reichlichkeit enthaltendes Aussaatmaterial, nicht so leicht zu erfüllen war als heute. Jetzt kann man dieselbe bei der Pockenlymphe auf die allerverschiedenste Weise, durch Zentrifugieren der Lymphe, durch Behandeln derselben mit Glycerin bei Bruttemperatur, durch subtilste Desinfektion der Haut des Kalbes am Rücken, Impfung an dieser Stelle und Okklusivverband, durch vierstündigen Aufenthalt der Lymphe in der Bauchhöhle des Kaninchens und wahrscheinlich auch noch auf manche andere Weise weit leichter erfüllen.

In einem Falle ist auch Lymphe von der Firma Merck in Darmstadt, durch freundliche Uebersendung seitens des Herrn Dr. Land-

mann erhalten, verwendet worden. Dieselbe erwies sich als völlig steril, war aber, wie auch bei Untersuchungen derselben Lymphe von anderer Seite festgestellt worden ist, entschieden in der Wirkung abgeschwächt. Bei einem Erstimpfling entwickelten sich an drei von vier Impfschnitten nur abortive Pusteln, der vierte Schnitt blieb reaktionslos.

Bei den Züchtungsversuchen sind nun Menschen- und Kälberserum im flüssigen und festen Zustande, natürlich stets von empfänglichen, nicht irgendwie immun gewordenen Individuen, für sich allein oder kombiniert mit den allerverschiedensten Stoffen organischer und anorganischer Natur, hauptsächlich herangezogen worden. Außerdem sind geprüft die übrigen Bestandteile des Blutes von Kälbern, vor allem Hämoglobinlösungen möglichst frischer Bereitung; ferner frischer und älterer Muskelsaft des Kalbes, durch Bakterienfilter keimfrei gemacht, also unerwärmt; frei von Zusätzen und in den verschiedensten Kombinationen; auch diese Nährböden in flüssigem und festem Zustande. Endlich ist wiederholt dasjenige Material, in dem sich die Vaccineerreger doch zweifellos vermehren, der Inhalt der Epidermiszellen des Kalbes, in möglichst wenig verändertem Zustand in Verbindung mit Kälberserum zu den Versuchen benutzt worden.

Die Resultate aller dieser sich über Jahre ausdehnenden Versuche sind, um es möglichst kurz zu sagen, völlig negative. Für meine Person habe ich aus allen diesen eigenen Versuchen die Ueberzeugung gewonnen, daß es nicht gelingt, eine praktisch brauchbare Vermehrung der Vaccinekeime auf den genannten künstlichen Substraten zu erzielen und daß es sich bei den Erregern der Kuhpocken um pflanzliche Organismen, die eine engere Verwandtschaft mit den verschiedenen uns bekannten mikroskopisch sichtbaren Bakterien zeigen, nicht handeln kann.

„Lorsqu'on examine au microscope, avec les plus forts grossissements, de la lymphe vaccinale recueillie au 4^e jour, en tubes capillaires, avec toutes les précautions de pureté possibles, on n'y trouve que très peu et quelquefois pas de bactéries colorables par les méthodes usuelles. A l'état frais, on y observe en revanche une multitude de grains extrêmement petits, réfringents, mobiles, qui semblent bien être les éléments virulents du vaccin, car on ne les rencontre jamais dans le sang, ni dans les exsudats recueillies chez les animaux en état d'éruption vaccinale“¹⁾.

Von der Anwesenheit dieser sehr kleinen, stark lichtbrechenden und beweglichen Körner in jeder Lymphe und in dem Inhalt jeder Pustel der Menschen- und Kuhpocken haben sich schon zahlreiche Untersucher überzeugt und kann man sich in der Tat jederzeit sehr leicht überzeugen. Sie sind vom vierten Tage an mit Sicherheit in großen Mengen in dem erwähnten Material zu finden.

Diesen Körnern bin ich während meiner Untersuchungen längere Zeit nachgegangen. Es war mir gelungen, dieselben Gebilde, wie ich glaubte, in größeren Mengen in besonderem künstlichem Nährboden sich entwickeln zu sehen und mit der siebenten Generation derartigen Materials Pusteln beim Kalbe zu erzeugen. Die Art der Bereitung dieses Nährmaterials will ich zunächst mitteilen, da es mir nicht ganz

1) Calmette et Guérin, Recherches sur la vaccine expérimentale. (Annales Pasteur 1901. p. 166.)

ausgeschlossen erscheint, daß auch von anderer Seite der Gedanke, auf dem anzugebenden Wege zum Ziele zu kommen, verfolgt werden könnte. Hat doch Babes bei der Züchtung des Hundswuterregers Gehirnsubstanz in ähnlicher Weise, wie ich gleich beschreiben werde, verwendet; wie er glaubt, mit einem gewissen Erfolge. Und hat doch auch Loewitz inzwischen bei seinen Leukämieparasiten Versuche zur Züchtung in Milz- und Lymphdrüsensubstanz gemacht (p. 236).

Blut und Fleischbestandteile des Kalbes hatten sich bei meinen Untersuchungen bereits mehrfach als unzulänglich zu Züchtungsversuchen erwiesen — auch die schon von Anfang an von mir gesehenen stark lichtbrechenden Körnchen waren nicht zur Entwicklung gekommen. Es blieb der Versuch, die inneren Organe des Kalbes, die kernreichen, als Nährmaterial zu verarbeiten. Viel Hoffnung wurde auf diesen Versuch nicht gesetzt, da es sehr fraglich erschien, ob die in Lösung gegangenen Nukleine und ähnliche Körper, die ja bekanntlich bei der Ernährung des Menschen als Ersatz für Eiweiß nicht dienen können, imstande sein würden, den Nährstoff für parasitäre niedere Organismen abzugeben. War doch sogar das Gegenteil, eine Abtötung solcher parasitärer Organismen, durch manche der zu verarbeitenden Organe, wie Milz, Knochenmark, nicht ausgeschlossen. Um so größer war mein Erstaunen, als sich herauszustellen schien, daß gerade dieses Material sich eignen sollte.

Die Bereitung des Nährbodens war folgende: Von einer $\frac{1}{10}$ Normal-Natrium- oder Kaliumhydroxydlösung wurden mehrere Liter bereitet und sicher sterilisiert. Mit dieser Lösung wurden die möglichst steril zerkleinerten Organe der verschiedensten Tiere, hauptsächlich von Rindern, Kälbern, Kaninchen, Meerschweinchen und Hunden, und zwar vor allem häufig die Milz, etwas weniger oft Leber und Nieren, ganz selten Gehirn und Knochenmark übergossen, eine Zeit lang extrahiert, dann ausgepreßt und durch steriles Fließpapier filtriert. Das Filtrat stellte, nachdem es mit steriler $\frac{1}{10}$ -Normalsäure auf brauchbare, übrigens verschieden hohe Alkaleszenzgrade gebracht war, den Nährboden vor, der also dadurch charakterisiert war, daß es sich um niemals über Körpertemperatur erwärmte Alkaliextrakte der lebenswichtigsten Organe handelte. Natürlich war es nicht leicht, solche Nährböden steril zu erhalten, da ja von dem Moment des Todes des Tieres andauernd Gelegenheit zur Infektion mit Mikroorganismen in reichstem Maße gegeben war. Trotz der gebrauchten Vorsichtsmaßregeln würde es vielleicht niemals gelungen sein, zum Ziele zu kommen, wenn nicht überall bester Wille und vor allem bei meinem damaligen Diener wahre Unermüdlichkeit vorhanden gewesen wäre. Was die Vorsichtsmaßregeln betrifft, so wurde, um das Material von den Schlachttieren zu erhalten, der Diener am Tage vorher von der Stunde des Schlachtens benachrichtigt, ging dann mit sterilisierter Doppelschale und einigen sterilen Messern zum Schlachthause, das betreffende Organ wurde mit gereinigten und nach damaliger Methode frisch desinfizierten Händen gefaßt und möglichst sofort nach Eröffnung der betreffenden Körperhöhle mit den mitgenommenen Messern herausgeschnitten. Nach der Herausnahme ging eine energische Abspülung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung an dem Organ vor sich. In der Doppelschale ins Laboratorium transportiert, wurde es sofort mit Fleischhackmaschine zerkleinert und zwar unter mehreren Lagen Fließpapier, die über der Maschine gespannt waren. Der aufgefangene Brei wurde mit der erwähnten

Alkalilösung im Verhältnis von 1 : 2, zuweilen auch mit mehr der Lösung versetzt und nun zunächst in Flaschen, die mit Korken verschlossen waren, eine halbe bis ganze Stunde im Schüttelapparat kräftig durchgeschüttelt. Die Flaschen wurden dann in einen großen Glasrichter der mit Sehtuch versehen war, entleert, das Sehtuch oben zusammengedreht und der Inhalt desselben mit den Händen ausgepreßt. Ueber die pressenden Hände war vorher ein Paar Gummihandschuhe gezogen, das 2 Stunden in 1⁰/₁₀₀ Sublimat gelegen hatte, die Hände selbst waren natürlich vorher gründlich nach Fürbringerscher Methode desinfiziert worden. Das in steriler Flasche aufgefangene Preßergebnis wurde dann in möglichst kleinen Portionen auf kleine in Fläschchen steckende Papierfilter gebracht, die in möglichst großer Zahl vorhanden waren, so daß höchstens immer 10—20 ccm des Extraktes auf ein Filter kamen. Das letztere war notwendig, weil besonders von den 1 : 2 Alkalilösung versetzten Breiextrakten, selbst nach 24 Stunden Filtrierens nur sehr wenig Filtrat erhalten wurde; die zähe, eiweiß- und mucinreiche Masse verlegte geradezu die Poren der Filter. Es war auch deshalb empfehlenswert, weil man hoffen konnte, aus mehreren kleinen Portionen später eher eine keimfreie zu erhalten, als wenn die ganze Masse vereint stundenlang in einem Filter filtriert hätte.

Dann wurde die ganze Batterie der Filter und Fläschchen mit mehreren Bogen Fließpapiers bedeckt und bei möglichst niedriger Temperatur sich selbst überlassen. Nach ca. 12—24 Stunden wurde das Filtrat aus den einzelnen Fläschchen unter peinlichen Vorsichtsmaßregeln, mit sterilen Pipetten, ohne Schütteln, in Reagenzgläser gefüllt, hier mit ¹/₁₀-Normalsäure versetzt, derart, daß eben keine sichtbare Trübung der ganz klaren bräunlichen Flüssigkeit eintrat, und die Reagenzgläser mit dem fertigen Nährboden dann in den Brutschrank gestellt. Nur solche Röhrchen wurden zu den Versuchen benutzt, die nach 4-tägigem Aufenthalt bei 37° C im Agarausstrich sich steril erwiesen. Ich brauche kaum besonders zu erwähnen, daß alle Gegenstände, mit denen das Material während der Zubereitung in Berührung kam, also Fleischhackmaschine und darüber gespanntes Fließpapier, die Gläser, in denen der Brei aufgefangen wurde, alle Flaschen, Korken und Glasrichter, Sehtuch, Reagenzgläser etc. vorher auf das sorgfältigste im strömenden Dampfe sterilisiert waren.

Trotz aller dieser Vorsichtsmaßregeln erhielt ich weit häufiger infizierte, als sterile Nährböden; und eine unendliche Geduld und Mühe gehörte dazu, nur von jedem Organ wenigstens einige Male keimfreies Material zu gewinnen. Mit Ausnahme des Kalbshirnextraktes, den ich nur einmal keimfrei erhielt, ist es mir indes bei sämtlichen Organen öfter gelungen.

Die auf die angegebene Weise steril erhaltenen Nährböden wurden im flüssigen und festen Zustande (mit 3 Proz. Agar $\bar{\bar{a}}$ versetzt) mit steriler, aber den Krankheitserreger reichlich enthaltender Lymphe beimpft. Als Ausgangsmaterial kam dabei hauptsächlich der Inhalt der Pusteln erstgeimpfter Kinder zur Verwendung, ferner Kälberpusteln in den verschiedenen Zeitpunkten ihrer Entwicklung. Jede einzelne Probe, die zur Aussaat diente, wurde auf ihre Fähigkeit geprüft, beim Kalbe echte Vaccinepusteln zu erzeugen. Zur Kontrolle dienten, wie schon erwähnt wurde, Blut von Kindern, die an akuten Exanthenen litten, so lange sie auf der Höhe der Krankheitsentwicklung sich befanden; das Blut und die Krankheitsprodukte staupekranker Hunde etc. Nach der

Impfung des Nährbodens blieb derselbe 8 Tage im Brutschrank bei 37° C stehen; dann wurde auf denselben Nährboden abgeimpft von dem ersten Röhrchen und damit die zweite „Generation“ hergestellt, die wieder 8 Tage im Brutschrank blieb, bis von ihr auf ein drittes Röhrchen desselben Nährbodens als dritte „Generation“ abgeimpft wurde etc. Natürlich fand in der Zwischenzeit eine wiederholte Untersuchung des Materials im hängenden Tropfen und gefärbten Zustande statt. Von der siebenten „Generation“ der auf diesem Nährboden „fortgezüchteten“ Lympherreger wurde ein Kalb in bekannter Weise in die Haut der rasierten Bauchdecken geimpft und von dem Erfolg der Impfung geschlossen auf die Möglichkeit, den Nährboden als Züchtungsmaterial für den Vaccinekeim zu benutzen. Die siebente Generation wurde als beweisend angesehen, weil in Vorversuchen festgestellt war, daß bei der Uebertragung von gleichen Mengen der Lymphe in Bouillon, Aufenthalt der letzteren im Brutschrank für 8 Tage und Abimpfung in weitere Bouillonröhrchen die Parasiten der Kuhpocken nur selten noch in dem fünften Bouillonröhrchen, bei der fünften „Generation“ nachweisbar, d. h. durch die Fähigkeit dieser Bouillon, beim Kalbe Vaccinepusteln zu erzeugen, feststellbar waren. In sechster „Generation“ habe ich niemals noch eine Wirkung dieser Bouillon beim Kalbe gesehen. Wenn man also von der siebenten „Generation“ auf dem Organextrakt-Nährboden positive Resultate erhielt, so schien damit der Beweis einer Vermehrung der Krankheitserreger in diesem Nährboden um so mehr erbracht, als ein Hineingelangen von Pockenkeimen in die Schnittwunden auf andere Weise, etwa von dem von früher her infizierten Stallboden oder dem Futter der Tierstände her, als ausgeschlossen gelten konnte und gelten kann, wie übrigens auch v. Wasielewski neuerdings gezeigt hat.

Die mikroskopischen Untersuchungen des Materiales im Nährboden zu verschiedenen Zeiten während des Aufenthaltes im Brutschrank zeigten, daß eine höchst auffallende Veränderung in dem Nährboden vor sich ging, die sich schon bei der Betrachtung mit bloßem Auge aufdrängte: der bis dahin völlig homogene, braune, durchsichtige Nährboden trübte sich allmählich, wurde schmutziggrau und ließ eine große Anzahl kleinster Bröckchen beim Schütteln erkennen. Während des Aufenthaltes im Brutschrank trat diese Veränderung allmählich und in immer zunehmendem Maße ein, nicht ganz regelmäßig und nicht immer gleich deutlich, aber doch im ganzen in gleichmäßiger Weise. Die mikroskopische Betrachtung ergab, daß eine große Anzahl kleinster Gebilde, zum Teil das Licht sehr stark brechend und lebhafteste Molekularbewegung zeigend, Gebilde, die sich mit Farbstoffen nicht darstellen ließen, in dem Nährboden, und zwar ebenfalls in mit dem Aufenthalt bei 37° steigender Zahl, vorhanden waren. Da nun unglücklicherweise bei den ersten Versuchen in un-beimpften oder mit etwas Glycerinwasser versetzten Kontrollröhrchen, die ebenfalls im Brutschrank gehalten waren, diese Veränderung innerhalb 8 Tagen nicht eintrat oder wenigstens bei weitem nicht so deutlich und ohne mikroskopisch nachweisbare stark lichtbrechende Körnchen, so glaubte ich in der Tat auf dem richtigen Wege zu sein und ein Mittel zur künstlichen Züchtung des Vaccineerregers gefunden zu haben. In dieser Meinung wurde ich natürlich besonders gefestigt durch den oben schon erwähnten Versuch, bei welchem es mit der siebenten „Generation“ meines „Nährbodens“ gelang, beim Kalbe echte Kuhpocken zu erzeugen.

Dieser positiv ausgefallene Versuch ist indes ganz vereinzelt geblieben,

also wohl auf Zufälligkeiten, reichlicheres Aussaatmaterial, weit größere Anzahl von Parasiten in der Ausgangslymphe oder dergleichen, zurückzuführen. Denn die mehrfache Wiederholung der oben auseinandergesetzten Versuchsanordnung hat ergeben, daß, wenn auch vielleicht eine sehr gute Konservierung, doch eine wirkliche dauernde Vermehrung des Kuhpockenkeimes auf dem beschriebenen Nährboden nicht stattfindet; daß der unempfindliche Nährboden an sich beilängerem oder kürzerem Aufenthalt im Brüttschrank, zuweilen, aus unbekanntem Gründen, schon nach ganz kurzer Zeit, Körnchen verdächtiger Beschaffenheit und sehr verschiedener Größe erzeugt, die auch ein sehr hohes Lichtbrechungsvermögen besitzen; und daß also auf dem eingeschlagenen Wege ein Fortschritt nicht zu erhoffen ist. Mir ist damit auch die Anschauung, daß die in der Vaccinepustel vorkommenden Körner die Erreger der Kuhpocken sind, hinfällig geworden. Ich halte diese Körner für Produkte der Einschmelzung von Zellen, die in dem sehr eiweißreichen Material allmählich auftreten, gleichgültig, wodurch die Einschmelzung bedingt wird. Eine Züchtung des Pockenkeimes ist also auch auf diesen Nährböden ausgeschlossen, ebensogut wie eine Züchtung der Erreger der anderen in den Bereich dieser Untersuchungen einbezogenen Krankheiten. (Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Ueber Niederschlagsbildung bei der Agglutination.

[Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie der k. k. Universität Innsbruck.]

Von Prof. Dr. **M. Löwit**, Innsbruck.

Mit 1 Tafel.

(Schluß.)

Bei diesen Untersuchungen stellte sich nun folgende gewiß beachtenswerte Erscheinung heraus. Wurden nämlich die mit dem aktiven Normal- oder Immenserum beschickten Röhrchen innerhalb der ersten 5—8 Minuten nach der Impfung rasch wieder dem Thermostaten entnommen zu einer Zeit, wo weder makro- noch mikroskopisch (im hängenden Tropfen) Zeichen der Agglutination vorhanden oder höchstens erst kleinste mikroskopische Häufchen von 5—8 Mikroben nachweisbar waren, und nun in der obenerwähnten Weise der energischen Zentrifugierung unterworfen, so konnte bereits nach der ersten, 8—10 Minuten währenden Zentrifugierung in den vom Boden des Spitzglases wieder aufgeführten Mikroben schon makroskopisch und dann auch mikroskopisch deutliche Agglutination erkannt werden, während in analog behandelten Kontrollpräparaten der der Einwirkung der Sera nicht unterworfenen Mikroben keine Spur von Agglutination weder makro- noch mikroskopisch nachweisbar war. Da in entsprechend geimpften Kontrollröhrchen mit Normalserum, die während der Dauer der Zentrifugierung anderer in gleicher Weise beschickter Röhrchen ruhig im Thermostaten geblieben waren, die Agglutination noch nicht oder nur viel geringgradiger eingetreten war, so mußte aus diesem Verhalten geschlossen werden, daß selbst nach der kurz dauernden Einwirkung

der Sera bereits eine Vorbereitung der Mikroben zur Agglutination eingetreten war, welche aber noch nicht hinreichte, um in dem sich selbst überlassenen Röhrchen um diese Zeit die Agglutination hervortreten zu lassen, welche aber nach Hinzutritt der auch nur kurze Zeit währenden Zentrifugierung genügte, um die Agglutination der vorbereiteten Mikroben zu bewirken.

Durch diese Beobachtungen erscheint ein unmittelbarer Hinweis gegeben zu sein auf die beiden zuerst von Bordet¹⁾ aufgestellten, dann von verschiedenen anderen Autoren acceptierten zwei Phasen des Agglutinationsprozesses. Bordet unterscheidet bekanntlich 1) jene Phase, in welcher die Mikroben (oder andere zellige Elemente) das Agglutinin in sich oder an sich fixieren, was von Ehrlich und Morgenroth²⁾ bereits vor Bordet erkannt worden war; und 2) jene Phase, wo infolge geänderter molekulärer Attraktion in der Lösung eine Berührung und Verbindung der Mikroben untereinander erfolgt. Beide Phasen des Prozesses konnten bereits von Bordet getrennt werden, und sie scheinen auch in unseren Versuchen durch die Wirkung der Zentrifugierung, wenn auch nicht in so scharfer Weise, wie bei Bordet, markiert zu sein. Man kann sich wohl dahin aussprechen, daß die Aenderung der molekulären Attraktion in unseren Beobachtungen wahrscheinlich durch die Zentrifugierung erfolgte, indem dabei die Mikroorganismen der Wirkung der Zentrifugalkraft folgen, mithin nach einer bestimmten Richtung fortbewegt und auf diese Weise miteinander in Berührung gebracht werden.

Allein welche Veränderungen oder Vorbereitungen müssen in den Mikroben stattgefunden haben, damit durch die Zentrifugierung die Agglutination derselben vollzogen wird, da doch normale, durch die fehlende Einwirkung der Sera nicht veränderte Mikroben durch die Zentrifugierung allein nicht agglutiniert werden? Diese Frage wird durch die bisherigen Beobachtungen nicht beantwortet, indem der Nachweis der physikalischen oder chemischen Fixierung des Agglutinins durch die Mikroben während der ersten Phase uns über jene Veränderungen der Mikroben (oder der zelligen Elemente überhaupt), die sie zur Agglutination geeignet machen, nicht orientiert.

Untersucht man nun mit Typhus- oder Choleraabakterien beschickte Immun- oder Normalsera, die nur wenige Minuten im Thermostaten belassen und zu einer Zeit aus demselben entnommen wurden, da weder makroskopisch noch im hängenden Tropfen irgendwelche oder nur ganz geringgradige Zeichen der Agglutination wahrnehmbar sind, in der oben auseinandergesetzten Weise, so findet man in den gefärbten Präparaten zwar vielfach größere und kleiner agglutinierte Haufen in der bereits geschilderten Form, aber wechselnde Mengen der Mikroben liegen isoliert, einzelweise, oder sind höchstens in ganz kleinen Gruppen von 2 bis 4 Mikroben miteinander verbunden. Gerade diese isoliert liegenden Mikroben lassen nun in gelungenen Präparaten mit genügender Deutlichkeit erkennen, daß viele derselben sicher rosa oder rotviolett gefärbte Anhängsel von verschiedener Form an dem Bakterienleibe besitzen (Fig. 4 c, d, e, Fig. 6 b, c), die man in Kontrollpräparaten von der Agglutininwirkung nicht ausgesetzten

1) l. c.

2) Berl. klin. Wochenschr. 1899. No. 1 u. 22; 1900. No. 21 u. 31.

Mikroben niemals vorfindet, die aber auch an manchen der isoliert liegenden Mikroben in den obenerwähnten Präparaten nach kurzer Agglutination fehlen können.

Diese Anhängsel umschließen entweder den Mikrobenleib vollständig oder sie sitzen ihm nur von einer Seite mehr zipfelförmig auf und können recht mannigfache Formen darbieten. Immer aber handelt es sich dabei um ganz kurze und kleine Gebilde, die nur bei scharfer Einstellung und bei guter Beleuchtung¹⁾ erkannt werden können. Diese Anhängsel erscheinen völlig strukturlos und amorph, wie die Zwischensubstanz in den agglutinierten Haufen überhaupt, und es kann wohl einem Zweifel nicht unterliegen, daß diese Anhängsel an den isolierten Mikroben mit der Zwischensubstanz der agglutinierten Haufen in tinktorieller und auch sonst in chemischer Beziehung übereinstimmen; alle Einwirkungen nämlich (Wärme, Säure, Alkali), welche Desagglutination hervorrufen, bringen die Zwischensubstanz in den agglutinierten Haufen und die eben erwähnten Anhängsel an den isolierten Mikroben zum Verschwinden, und es ist wohl sehr wahrscheinlich, daß dabei eine Lösung der Zwischensubstanz in den Haufen und eine Lösung der geschilderten Anhängsel stattfindet; indessen sei doch besonders betont, daß das Verschwinden der Zwischensubstanz und der sogenannten Anhängsel sowie die Unmöglichkeit, dieselben nach der Desagglutination der Mikroben färberisch wieder darzustellen, nicht unbedingt der Ausdruck eines Lösungsprozesses sein muß.

Acceptiert man diese Annahme, daß die Zwischensubstanz in den agglutinierten Haufen und die sogenannten Anhängsel der isolierten Mikroben zusammengehörige und identische Gebilde sind, so erscheint damit eine Grundlage für die Entstehung der Zwischensubstanz in den agglutinierten Haufen gewonnen zu sein. Die genannten Bilder weisen nämlich darauf hin, daß unter Einwirkung der agglutinierenden Ursache aus dem Mikrobenleibe gewisse in tinktorieller und chemischer Beziehung vom Mikrobenleibe differente Substanzen austreten und mit dem Mikrobenleibe als die sogenannten Anhängsel im Zusammenhang stehend nachgewiesen werden können. Ueber die chemische Beschaffenheit dieser ausgetretenen Substanz (Anhängsel) und über die Veränderung, welche dieselbe unter der Einwirkung der agglutinierenden Ursache erleidet, geben die vorliegenden färberischen Untersuchungen keine Auskunft, doch ist es ja aus anderweitigen chemischen Untersuchungen im hohen Grade wahrscheinlich gemacht, daß die Wechselwirkung zwischen agglutinierender Ursache (Agglutinin) und agglutinierbarer Substanz als ein den Gerinnungsvorgängen nahestehender Prozeß aufzufassen ist, dessen Substrat nun auch morphologisch in der Zwischensubstanz und den sogenannten Anhängseln wahrscheinlich nachgewiesen ist.

Das Wesen der Agglutination im Normal- und Immunserum wird daher auf Grund der vorliegenden Beobachtungen in Uebereinstimmung mit der Theorie von Paltauf wohl als eine Niederschlagsbildung unter aktiver Mitbeteiligung des Bakterienleibes aufzufassen sein, wobei allerdings eine Entscheidung der Frage durch die vorliegenden Untersuchungen nicht gegeben ist, ob die aus dem Bakterienleibe austretenden Substanzen auch primär am Bakterienleibe entstehen und

1) Bei künstlicher Beleuchtung (Auerlicht und elektrisches Licht) sind die geschilderten färberischen Differenzen weit schlechter als bei Tageslicht zu erkennen.

fixiert werden, oder ob diese Substanzen erst frei in die umgebende Flüssigkeit übertreten¹⁾, hier niedergeschlagen werden und sich erst sekundär am Bakterienleibe fixieren. Eine wesentliche Schädigung der Form und Beschaffenheit des Bakterienleibes muß, nach den hierüber bekannten Erfahrungen, durch diese die Agglutination bedingende Veränderung des Bakterienleibes nicht eintreten, ob jedoch diese Veränderung nicht in einer gewissen, die Einwirkung anderer schädigender Einflüsse (Alexin) fördernder Beziehung steht, ist auf Grund dieser Beobachtungen nicht direkt zu entscheiden.

Wir werden uns also bezüglich des Zustandekommens der Bakterienagglutination im Normal- und Immunserum auf Grund der hier mitgeteilten Befunde dahin aussprechen können, daß bei der Agglutination Niederschlagsbildungen in und an den Mikroben und vielleicht auch frei in der umgebenden Flüssigkeit aus dem Bakterienleibe entstammenden Substanzen zu stande kommen, die tinktoriell in den diesbezüglichen Präparaten nachweisbar sind. Diese Niederschlagsbildungen dürfen als die Ursache der Verbindung der Mikroben untereinander, mithin als ein wesentliches Moment der Agglutination angesprochen werden. Ob nun diese Verbindung in der Weise bewerkstelligt wird, daß die mit den Anhängseln (Niederschlägen) behafteten Mikroben durch geänderte Gravitations- und Attraktionsverhältnisse einander genähert und dann miteinander vereinigt werden, oder ob dieselben durch freie, der gleichen Quelle entstammende Niederschläge abgefangen werden, oder ob durch derartige Niederschlagsbildungen geänderte Verhältnisse der molekularen Attraktion zwischen den Mikroben und der umgebenden Flüssigkeit im Sinne Bordets veranlaßt werden, oder ob alle drei Momente an dem Zustandekommen der Agglutination mitwirken, wird durch die vorliegenden Beobachtungen nicht entschieden. Indessen wird durch diesen Umstand an der Auffassung der Agglutination als einer durch (spezifische) Niederschlagsbildungen bedingten Erscheinung nichts geändert. Es ist übrigens nicht ausgeschlossen, daß die von Gruber²⁾ zuerst beschriebenen und als Ursache der Agglutination angesprochene Quellungsbilder der Mikroben durch die im vorausgehenden geschilderten Niederschlagsbildungen an den Mikroben bei der Agglutination bis zu einem gewissen Grade mitveranlaßt wurden. Die von Neufeld³⁾ vor kurzem beschriebene Quellung der Pneumokokken bei der Agglutination derselben durch ein Immunserum wird von Neufeld selbst nicht als eine Stütze der Gruberschen Quellungstheorie angesprochen, andererseits wird diese Erscheinung aber auch nicht auf Komplementwirkung zurückgeführt. Neufeld meint, daß es sich bei den Pneumokokken um einen ganz speziellen Fall handelt; indem nur bei diesen eine sichtbare Quellung mit den durch die Agglutininwirkung bedingten Gerinnungsvorgängen in den oberflächlichen Schichten der Bakterienzelle zu stande kommt.

Die im vorausgehenden angeführte Färbung der bei der Bakterien-

1) Der chemische Nachweis der aus den Mikroben stammenden sogenannten „Bakterienkoaguline“ ist durch E. P. Pick (l. c.) erbracht worden.

2) Münch. med. Wochenschr. 1896. p. 285. Deutsche med. Wochenschr. 1896. p. 234. Wien. klin. Wochenschr. 1896. No. 11 u. 12. Münch. med. Wochenschr. 1899. p. 1329.

3) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XL. 1902. p. 54.

agglutination zu stande kommenden Niederschlagsbildungen wurde auch an den nach der Methode von R. Kraus hergestellten Präzipitinen (Koaguline) geprüft, und zwar wurde ausschließlich das durch Kaninchenimmunserum ausgefällte Präzipitin in einer filtrierten Typhusbouillonkultur der angegebenen Färbung unterzogen, wobei sich dieses letztere in tinktorieller Beziehung und auch in seinen Löslichkeitsverhältnissen (gegen Wärme, Säure und Alkali) völlig gleich mit der sogenannten Zwischensubstanz der durch Immunserum agglutinierten Typhusbacillen verhielt. Damit erscheint wohl ein nicht unwichtiger Hinweis, gewiß aber kein unbedingter Beweis, für die Identität der Präzipitine und der agglutinablen Substanz gegeben, die, wenn auch neuerdings noch durch Beljaeff¹⁾ geleugnet, doch durch die Beobachtungen von Kraus und Pirko²⁾, von Ford³⁾, Klein⁴⁾, Wassermann⁵⁾ und anderen gut gestützt erscheint. Man wird aber, wie auch Wassermann⁶⁾ und Klein⁷⁾ hervorheben, bei der Beurteilung der Beziehungen zwischen Präzipitinen und agglutinabler Substanz immer darauf zu achten haben, daß in alten Kulturfiltraten neben der durch das Immunserum ausgefällten agglutinablen Substanz gewiß auch noch andere aus den ausgelaugten Bakterienkörpern herrührende Substanzen als Bestandteil des Präzipitates vorhanden sein können, ein Moment, das bei der Beurteilung einer etwa vorhandenen Inkongruenz zwischen Präzipitinbildung und Agglutination gewiß im hohen Grade Beachtung verdient. Da mithin der bei der Präzipitation gebildete Niederschlag nicht ausschließlich aus der bei der Agglutination in Betracht kommenden agglutinablen Substanz des Bakterienleibes bestehen muß, da ferner, wie namentlich Klein gezeigt hat, der bei der Präzipitierung entstehende Niederschlag mit jenem bei der Agglutination sich bildenden nicht identisch sein muß, wenn sie auch nahe verwandt sein können, und da endlich nach den Untersuchungen von Eisenberg und Volk⁸⁾ ein sehr wechselndes Bindungsvermögen zwischen Agglutinin und agglutinierbarer Substanz besteht, so wird auch eine etwa vorhandene Inkongruenz zwischen Präzipitinbildung und Agglutination nicht als ein direkter Beweis gegen die Annahme angesehen werden können, daß spezifische Niederschlagsbildungen bei der Entstehung der Agglutination und bei der Präzipitierung in Betracht kommen.

Weitere Untersuchungen werden zu entscheiden haben, ob bei jeglicher Form der Agglutination und Haufenbildung von Mikroben eine Zwischensubstanz, wie bei der im Serum unter den geschilderten Bedingungen zu stande kommenden Agglutination, vorhanden ist, oder ob es auch Zwischensubstanzen von verschiedener tinktorieller und dann wohl auch chemischer Beschaffenheit, eventuell Haufenbildung ohne Zwischensubstanz gibt, worüber zunächst genügende Erfahrungen noch nicht gesammelt werden konnten.

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. 1903. p. 293, 369.

2) Ebenda. Bd. XXXII. 1902. No. 1.

3) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XL. 1902. p. 362.

4) Wien. klin. Wochenschr. 1903. No. 5 u. 6.

5) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLII. 1903. p. 276 f.

6) a. a. O. p. 281.

7) a. a. O. No. 6.

8) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XL. 1902. p. 155 f.

Ein Blick auf die beigegebenen Abbildungen (Fig. 1—6) zeigt ein recht mannigfaches Aussehen und ein verschiedenes Verhalten der Mikroben bei der Agglutination. So erscheinen die Typhusbacillen in den agglutinierten Haufen der Fig. 3 und 4 von völlig normaler Beschaffenheit, während dieselben in den Haufen der Fig. 1 und 2 mehr oder weniger hochgradige Veränderungen ihrer Form und Beschaffenheit erkennen lassen. Ebenso erscheinen die Choleravibrionen in den Haufen der Fig. 5 und 6 hochgradig verändert, während die isolierten, aber bereits mit Niederschlägen versehenen Vibrionen der Fig. 6 bei c) noch völlig normale Verhältnisse erkennen lassen; auch typische Agglutination der Choleravibrionen bei völlig normalem Aussehen derselben kann, wie sofort näher zu erörtern sein wird, erzielt werden. Gegenüber dieser verschiedenen Beschaffenheit der agglutinierten Mikroben selbst wird wohl die Frage aufzuwerfen sein, inwiefern derartige Veränderungen des Bakterienleibes mit zum Zustandekommen der Agglutination gehören oder ob dieselben nur eine mehr nebensächliche, vielleicht durch anderweitige Verhältnisse bedingte Begleiterscheinung der Agglutination darstellen.

In dieser Beziehung zeigten die Beobachtungen am Immunsorum (Typhus- und Choleraimmunsorum), daß hier, abgesehen von der charakteristischen Niederschlagsbildung, die Agglutination bei vollständig normalem Aussehen der Mikroben zu stande kommen kann (Fig. 3 und 4). Derartige Bilder sind aber nur dann zu erzielen, wenn nach möglichst kurzer Einwirkung des Serums die Agglutination bereits entwickelt oder doch durch die vorhandenen Niederschlagsbildungen am Mikrobenleibe selbst bereits vorbereitet ist, was ja tatsächlich beim Immunsorum der Fall ist, in welchem ja bekanntlich der spezifische Rezeptor (Agglutinin) in bedeutend verstärktem Grade vorhanden ist. Auch bei möglichst kurzer Einwirkung des Immunsorums auf die Mikroben erhält man ab und zu agglutinierte Haufen, in welchen bereits Veränderungen der Mikroben erkannt werden können, aber mehr oder weniger zahlreiche Haufen zeigen unter diesen Verhältnissen doch dem Aussehen nach völlig normale Mikroben, so daß man gerade aus derartigen Bildern die Überzeugung gewinnt, daß zum Zustandekommen der Agglutination (abgesehen von der Niederschlagsbildung) morphologisch nachweisbare Veränderungen des Bakterienaussehens nicht gehören.

Je länger man aber das betreffende Serum (Immun- oder Normalserum) auf die Mikroben einwirken läßt, desto sicherer kann man das Vorhandensein von morphologisch nachweisbaren Veränderungen der agglutinierten Mikroben erwarten, die zwar in den zu Haufen vereinigten Mikroben auch in den gefärbten Präparaten nicht im Detail verfolgt und erkannt werden können, als deren hervorstechendstes Merkmal aber die Anwesenheit deutlicher grober und feiner Granula bezeichnet werden muß, wie sie sowohl an den unter diesen Verhältnissen agglutinierten Typhusbacillen (Fig. 1 und 2), noch besser aber an Choleravibrionen (Fig. 5 und 6) nachgewiesen werden können. Es sind also im wesentlichen jene Veränderungen der Mikroben, welche unter der Bezeichnung des Pfeifferschen Phänomens zusammengefaßt werden, von welchem es ja bereits bekannt ist, daß es auch extra corpus unter der Einwirkung eines aktiven Serums als der Ausdruck der bakteriolytischen oder bakteriziden Wirkung eintreten kann.

Da nun auf Grund unserer gegenwärtigen Kenntnisse im Immuns-
serum doch vorwiegend der spezifische Ambozeptor, nicht aber das
bereits normalerweise vorhandene Komplement (Alexin) vermehrt ist, so
weisen wohl die oben mitgeteilten Befunde darauf hin, daß das Auf-
treten der Pfeifferschen Granulabildung an den agglutinierten Mikroben
vorwiegend als Komplementwirkung aufzufassen ist und nicht in direkter
Beziehung zur Niederschlagsbildung als solcher mithin zur Agglutination
steht. In Uebereinstimmung mit den Angaben zahlreicher Autoren
weisen also auch diese Beobachtungen darauf hin, daß Agglutinin-
wirkung und Komplementwirkung auf die Mikroben eine
verschiedene ist, insofern beide Wirkungen eine verschiedene Be-
einflussung der Mikroben hervorrufen, weshalb sie wohl als eine weitere
Stütze der Annahme angesprochen werden dürfen, daß die Agglu-
tinin- und die Komplementwirkung auch durch verschie-
dene Ursachen veranlaßt wird.

Als weitere Stütze dieser Auffassung kann darauf hingewiesen
werden, daß die Granulabildung im aktiven Serum für sich
allein ohne jegliche Agglutination zu stande kommen
kann. Stünde tatsächlich die Granulabildung in näherer Beziehung zur
Agglutination, so wären in einem solchen Falle wohl die günstigsten
Bedingungen für die Agglutination gegeben: allein eine solche fehlt hier
in der Regel vollständig oder sie ist nur in minimalen Ansätzen neben
der Granulabildung nachweisbar. In dieser Beziehung haben gerade die
Studien am Affenserum (*Hamadryas macacus*) ergeben, daß das Pfeif-
fersche Phänomen im unverdünnten aktiven Serum schon wenige Mi-
nuten nach der Aussaat der Typhusbacillen in intensivem Grade vor-
handen ist. Während unmittelbar nach der Impfung die Typhusbacillen
in den Präparaten aus dem Affenserum noch in völlig normaler Be-
schaffenheit angetroffen werden (Fig. 7 a), findet man schon nach einem
Aufenthalte des geimpften Röhrchens von 5—10 Minuten im Thermo-
staten bei 37° C die Granulabildung sehr deutlich neben dem Aussehen
nach normalen Typhusbacillen entwickelt (Fig. 7 b); die Granula sind
dabei nach der Nocht-Färbung gut, wenn auch schwach blau tingiert,
zeigen verschiedene Größe und meist runde Form. Nach längerer Ein-
wirkung des Affenserums sind die Granula nahezu regelmäßig im ge-
färbten Präparate deutlich metachromatisch tingiert (Fig. 7 c). Derartige
geimpfte Sera erwiesen sich in einzelnen Fällen nach 1—2-stündigem
Aufenthalte im Thermostaten auch bei Kulturversuchen völlig steril, die
Mikroben waren darin sämtlich abgetötet, in anderen Fällen gingen die
auf Bouillon überimpften Kulturen nach 24 Stunden noch gut an, wie
ja auch mehrfach im gefärbten Präparate aus Affenserum nach längerer
Einwirkung noch vereinzelte gut erhaltene Typhusbacillen nachweisbar
waren (Fig. 7 c).

Cholera-vibrionen gegenüber erwies sich das aktive Affenserum
ebenso wirksam, die rasche und intensive Granulabildung kam auch
hier in sehr deutlicher Weise zur Erscheinung (Fig. 7 d), doch fanden
sich hier auch nach kurzer Einwirkung vielfach bereits geringgradige
Zeichen der Agglutination (Fig. 7 d*). Die Sera beider Affen erwiesen
sich in der geschilderten Beziehung völlig gleichartig: starke Granula-
bildung an Typhusbacillen ohne jegliche Agglutination; starke Granula-
bildung an Cholera-vibrionen mit geringgradiger, auch weiterhin sich

nicht steigernder Agglutination¹⁾. Das normale aktive Affenserum enthält mithin ein sehr wirksames (dominantes²⁾) Komplement gegen die beiden Mikrobenarten nebst den zugehörigen wirksamen bakteriolytischen Ambozeptoren gegen die beiden Mikrobenarten, es ist aber nicht im stande, Agglutination der Typhusbacillen und nur sehr geringgradige Agglutination von Cholera-vibrionen zu erzielen. Diese Unabhängigkeit der beiden Wirkungen in dem gegebenen Beispiele dient als weitere Stütze der oben angeführten Auffassung.

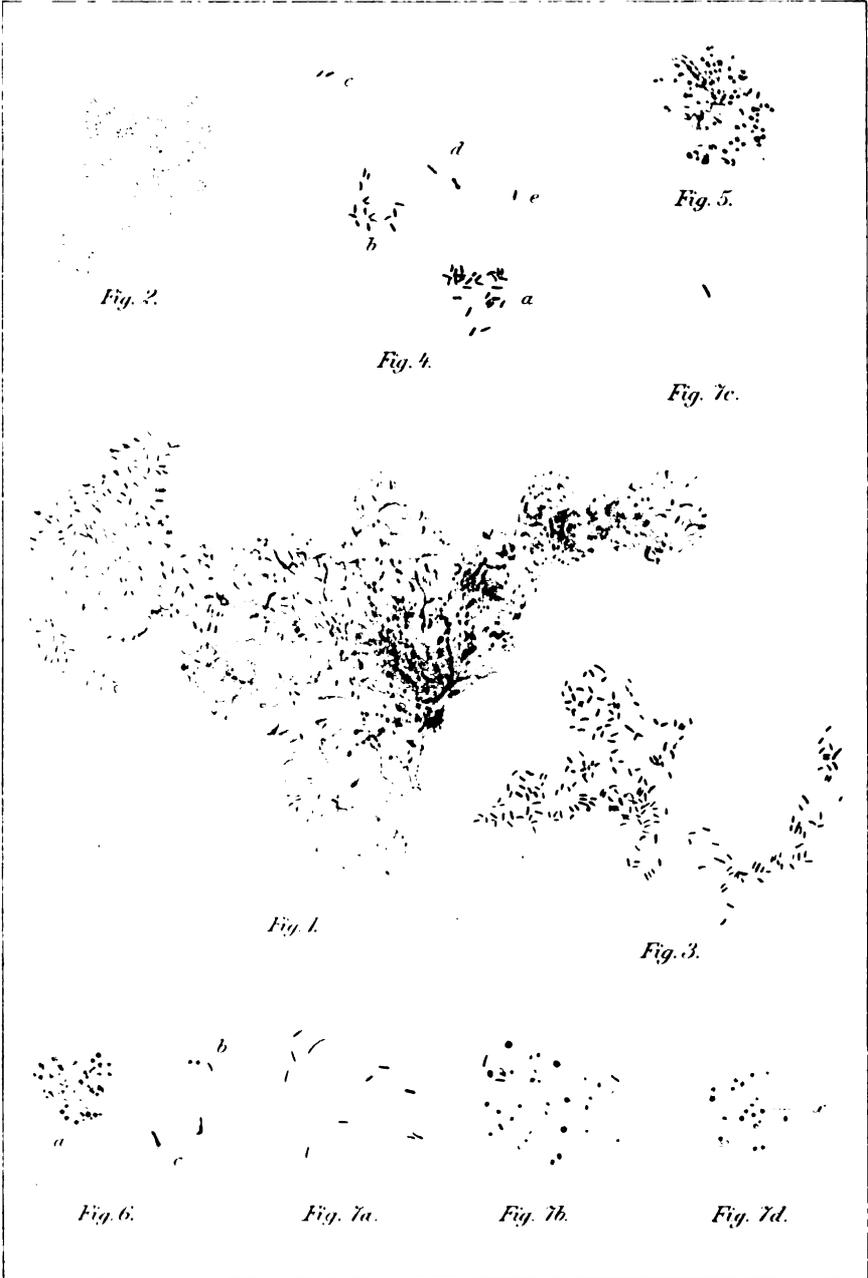
Auch im normalen aktiven Rinderserum fand sich die Granulabildung an Cholera-vibrionen (Komplementwirkung), hier aber stets mit Agglutination kombiniert (Fig. 6a—c), stark entwickelt vor. Normales unverdünntes Meerschweinchen serum zeigt gleichfalls bereits nach Einwirkung von 5 Minuten namentlich bei Cholera-vibrionen starke Granulabildung, die nach einer Einwirkung von 10—12 Minuten noch an Intensität zunimmt; auch hier ist Agglutination stets gleichzeitig nachweisbar. Unverdünntes normales Kaninchenserum wurde bezüglich der Granulabildung weit weniger wirksam befunden; hier läßt sich meistens nach $\frac{1}{2}$ —1-stündiger Einwirkung (auf Typhus und Cholera) ausgebildete Agglutination, aber nur geringgradige Granulabildung an den Mikroben erkennen. Doch kommen hierbei zahlreiche graduelle Schwankungen bei den verschiedenen Tieren vor.

In dem durch Wärme inaktivierten Immuserum fehlt die Granulabildung den Typhusbacillen gegenüber in der Regel vollständig, während Agglutination hier, wenn auch abgeschwächt, noch deutlich nachgewiesen werden kann; in dem inaktivierten Cholera-immuserum können hingegen immer noch auf Granulabildung hinweisende Bilder an Cholera-vibrionen, wenn auch spärlicher als am aktiven Immuserum, vorkommen. Ganz analog verhält es sich auch am Normalserum. Die im normalen aktiven Affenserum so ausgeprägte Granulabildung gegen Typhusbacillen fehlt im inaktivierten Affenserum vollständig, ist aber in diesem gegen Cholera-vibrionen noch teilweise erhalten. Diese Verhältnisse dürften wohl mit der bereits hervorgehobenen, so leicht eintretenden Plasmolyse und Plasmoptyse der Cholera-vibrionen in Zusammenhang stehen, welche die Beurteilung der Granulabildung an den Cholera-vibrionen unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht unwesentlich erschweren, wobei außerdem die Mitwirkung differenter Teilkomplemente im Serum in Betracht gezogen werden könnte. Im inaktivierten Rinderserum (vom normalen Tiere) war übrigens die Granulabildung an Cholera-vibrionen gleichfalls nur sehr geringgradig entwickelt, während sie am aktiven Serum sehr intensiv vorhanden war.

Gelegentlich wurde am Normalserum vom Meerschweinchen, Affen und Rind die Beobachtung gemacht, daß die nach kurzer Zeit der Einwirkung des Serums sehr deutlich nachweisbare Granulabildung an den Mikroben bei längerer Dauer der Einwirkung derselben überhaupt nicht mehr konstatiert werden konnte, oder daß doch neben den Granulabildungen dem Aussehen nach völlig normale Mikroben in großer Anzahl vorhanden waren. Bei genügend langem Aufenthalte (15—24 Stunden) derartiger Sera im Thermostaten bei 37° C können dann nur noch normal aussehende Mikroben im Serum vorhanden sein. Es ist wohl

1) Ein Coli-Stamm (Coli III) wurde durch das Affenserum morphologisch gar nicht affiziert und ließ nur sehr geringgradige Agglutination erkennen.

2) Ehrlich u. Sachs, Berl. klin. Wochenschr. 1902. p. 297.



Verzweigungsbildung u. d. Agglutination. (L. Löwit)

Verzweigungsbildung u. d. Agglutination.

sehr wahrscheinlich, daß es sich dabei um eine nachträgliche Vermehrung von Mikroben im Serum handelt, die zur sekundären Entstehung normal beschaffener Mikroben Veranlassung gibt, sei es deshalb, weil diese Mikroben vielleicht Abkömmlinge jener früher erwähnten normal gebliebenen Mikroben darstellen, welche der Granulabildung einen besonderen Widerstand entgegengesetzten und ihr entgangen sind, sei es deshalb, weil möglicherweise bei dem längeren Aufenthalte im Thermostaten die Ursache der Granulabildung (Komplement) aufgebraucht oder in entsprechender Weise von den der Granulabildung unterliegenden Mikroben fixiert und chemisch gebunden wird, weshalb die neugebildeten Mikroben die Komplementwirkung nicht zeigen. Jedenfalls folgt aus diesen Beobachtungen, daß man bei der Feststellung der Granulabildung an den Mikroben unter den gewählten Versuchsbedingungen der Untersuchung der Mikroben nach verhältnismäßig kurzer Einwirkung des Serums (ca. 1 Stunde) das Hauptaugenmerk zuwenden muß.

Erklärung der Abbildungen.

Die Färbungsmethode ist im Texte beschrieben. Sämtliche Abbildungen sind mit Reicherts homog. Immersion $\frac{1}{12}$, Apert. 1,30, Komp.-Okular 4 vom akad. Maler Herrn J. Durst angefertigt.

Fig. 1. Agglutiniertes Typhusbacillenhaufen (Typhus S) aus Typhusimmenserum 1:125 vom Kaninchen; 12 Stunden bei 37° C. Nochtblau-Eosin.

Fig. 2. Agglutiniertes Haufen von Typhus S aus Rinderserum unverdünnt; 7 Minuten bei 37° C. Nochtblau-Eosin.

Fig. 3. Agglutiniertes Haufen von Typhus S, Typhusimmenserum vom Kaninchen, unverdünnt; 5 Minuten bei 37° C. Nochtblau-Eosin.

Fig. 4. Wie vorausgehend.

Fig. 5. Agglutiniertes Haufen von Cholera-(Krakau-)Immenserum 1:125 Meer-schweinchen; 1 Stunde bei 37° C. Nochtblau.

Fig. 6. Agglutiniertes Haufen und isolierte Vibrionen Cholera-Kr. aus Rinder-serum unverdünnt, 8 Minuten bei 37° C. Nochtblau-Eosin.

Fig. 7.

- | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------|-----|--------------|-------------|-------|--------|------|-----|----------|-----|--------|
| a) | Typhusbacillen | aus | Normalserum, | unverdünnt, | Affe, | sofort | nach | der | Impfung. | | |
| b) | " | " | " | " | " | " | " | 12 | Minuten | bei | 37° C. |
| c) | " | " | " | " | " | 60 | " | " | 37° C. | | |
| d) | Cholera-vibrionen, | " | " | " | " | 8 | " | " | 37° C. | | |
- a—d) Färbung mit Nochtblau.

Nachdruck verboten.

Ueber die Bindungsverhältnisse zwischen Toxin und Antitoxin¹⁾.

[Aus dem hygienisch-bakteriologischen Institute der Jagellonischen Universität Krakau (Vorstand: Prof. O. Bujwid).]

Von Dr. **Philipp Eisenberg**, Assistenten am Institute.

Die Frage nach dem Wesen der Wirkung der Antitoxine auf die Toxine hat seit der Entdeckung dieser merkwürdigen Stoffe die hervorragendsten Forscher beschäftigt und gar manche Untersuchungen zu Tage gefördert, die für die ganze moderne Immunitätslehre von größter Bedeutung geworden sind. Nachdem im Anfange der 90er Jahre der

1) Vorgelegt der mathem.-naturwiss. Sektion der Akademie der Wissenschaften zu Krakau in der Sitzung vom 4. Mai 1903.

Streit, ob die Antitoxine auf den zu schützenden Organismus oder aber direkt auf die Toxine einwirken, zu Gunsten dieser letzteren Anschauung unterschieden war, kam in den letzten Jahren auf Grund zahlreicher Untersuchungen, unter denen in erster Linie die genialen Arbeiten Ehrlichs zu nennen sind, die Anschauung von Ehrlich und Behring, wonach die Antitoxine mit den Toxinen nach einfachen chemischen Gesetzen zu neutralen Verbindungen zusammentreten, zu fast unbestrittener Herrschaft. Diese Anschauung hat zweifellos das Verdienst, die naive Vorstellung von einer Zerstörung des Toxins durch das Antitoxin zurückgedrängt zu haben, andererseits schaffte sie für die Immunitätslehre eine feste Basis, indem sie den Prozeß der Giftneutralisation aus dem Gebiete unbekannter mystischer Vorgänge im Organismus in dasjenige der Chemie verlegte. Es zeigte sich aber in der Folge, daß diese Anschauung, die sich an die einfachsten Prozesse anlehnte, nicht im stande ist, alle komplizierten quantitativen Verhältnisse der Giftneutralisation hinreichend zu erklären. Den ersten Beweis dafür erbrachte Ehrlich selbst, indem er zur Erklärung der Neutralisationsverhältnisse des Diphtheriegiftes die sehr geistreichen, aber auch sehr komplizierten Hypothesen über die Konstitution des Giftes heranziehen mußte. Eine Reihe von Untersuchungen der letzten zwei Jahre, die sich mit den Bindungsverhältnissen verschiedener spezifischer Immunkörper befassen, sowie vor allem zwei höchst bedeutende Arbeiten, die die Frage der Toxin-Antitoxinbindung zum Gegenstande haben — ich meine die Arbeiten von Danysz und Bordet — scheinen neue Gesichtspunkte in dieser Frage zu eröffnen und versprechen für manche dunkle Tatsache auf diesem höchst interessanten Gebiete Aufklärung zu schaffen. Im folgenden möchte ich eine Anschauung über diese Fragen zum Ausdrucke bringen, die sich bei mir seit mehr als einem Jahre entwickelt hat, und die, wenn ich auch leider bis jetzt keine Gelegenheit hatte, eine experimentelle Grundlage für sie zu schaffen, den Vorzug besitzt, die Bindungsverhältnisse aller Immunkörper unter einem einheitlichen Gesichtspunkte aufzufassen und zur Erklärung mancher bisher unaufgeklärter Erscheinungen herangezogen werden zu können.

Diese Untersuchungen über die Bindungsverhältnisse von Toxin und Toxin auf Grund des Tierexperimentes sind selbst in der klassischen Form, wie sie durch die Arbeiten von Ehrlich und Behring statuiert wurde, wenig geeignet, uns über diese komplizierten Fragen exakte Aufschlüsse zu geben, zumal als Reagens ein lebender Organismus dient, der die Resultate in mannigfacher, uns oft unbekannter Weise beeinflussen kann. So erscheint es verständlich, daß man zunächst an anderen Immunkörpern diese Fragen eingehender studierte, wo das lebende Reagens entbehrlich war, um erst dann diese Resultate für die Lösung der Toxin-Antitoxinfrage zu verwerten. Durch seine schönen Untersuchungen über Ricinimmunität einerseits, durch die grundlegenden Arbeiten über die Hämolyse andererseits hat uns Ehrlich diesen neuen Weg in der Immunitätslehre, denjenigen der Reagenzglasversuche, eröffnet, der sich in der Folge so fruchtbringend zeigen sollte. Diese Methode hat den großen Vorteil, daß sie ein ganz eingehendes Studium der betreffenden Vorgänge ermöglicht und dabei oft ein so exaktes, „daß man in einer späteren Zeit, wenn unsere chemischen Kenntnisse weiter vorgeschritten sein werden, nur die chemische Verbindung für die dormalige fragliche Substanz wird einzusetzen brauchen und die Tatsache bleibt vollständig richtig“ (Paltauf). Die ersten Versuche in dieser

Richtung beziehen sich auf die Bindung der Hämolsine an die Erythrocyten; in seinem bekannten Versuche hat Bordet gezeigt, daß, wenn man einerseits zu einer gewissen Menge hämolytischen Serums, z. B. zu 0,4 ccm Serum 0,5 ccm Blutaufschwemmung, d. i. die Blutmenge, die eben gelöst wird, zusetzt, so tritt nach einiger Zeit vollkommene Lösung ein. Wenn man aber andererseits zu derselben Serummenge dieselbe Blutmenge, jedoch nicht auf einmal, sondern successive in 5 Portionen von 0,1 ccm zusetzt, so werden nur die ersten zwei, also zusammen 0,2 ccm, gelöst, die dritte bleibt schon intakt.

Diesen Versuch deutete Bordet ganz folgerichtig in der Weise, daß im zweiten Falle die ersten Dosen mehr Hämolsin an sich reißen, als zu ihrer Auflösung nötig ist, wodurch das Hämolsin des Serums rasch erschöpft wird. Es war dadurch gezeigt, daß die Bindung des Hämolsins an die Erythrocyten durchaus nicht den Gesetzen einfacher konstanter Proportionen folgt, wie sie für die Bindung des Toxins durch Antitoxin angenommen werden. Bordet verglich damals diese Vorgänge mit denjenigen bei der Färbung, stellte jedoch unnötigerweise einen Gegensatz auf zwischen ihnen und den chemischen Prozessen im eigentlichen Sinne des Wortes („réactions chimiques proprement dites“), indem er für die letzteren das Bestehen klar ausgesprochener Proportionen postuliert. In ähnlichem Sinne, wie der Versuch Bordets, sprachen die leider nur nebenbei erhobenen quantitativen Befunde von Ehrlich und Morgenroth bezüglich der Bindung des hämolytischen Zwischenkörpers an die Erythrocyten. Von einigen in der V. und VI. Mitteilung enthaltenen Versuchen sei folgender angeführt: Gibt man zu 1 ccm Ziegenblutaufschwemmung wechselnde Mengen eines auf Ziegenblut eingestellten Kaninchenimmuserums und untersucht nach einiger Zeit die von den Erythrocyten dekantierte obere Flüssigkeit auf ihren Hämolsinwert, so findet man, daß bis zu 60 komplett lösenden Dosen der ganze zugegebene Zwischenkörper gebunden wird, bei Zusatz von 80 Dosen findet man in der oberen Flüssigkeit einen unverankerten Ueberschuß entsprechend $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{4}$ lösender Dosis, erst bei Zusatz von 100 lösenden Dosen bleibt eine lösende Dosis frei. Es kann also 1 ccm Blutaufschwemmung bei wechselndem Zusatze von Immuserum 1—99 lösende Dosen binden, und zwar ist die Kapazität der Blutrezeptoren nicht etwa eine konstante, so daß bis zu 99 lösenden Dosen der ganze Zwischenkörper gebunden würde und erst die 100. freibleibe, sondern von 60 Dosen an bleiben nicht gebundene Ueberschüsse, die immer größer werden. Als ein sehr dankbares Objekt für diese Art von Untersuchungen erwiesen sich die quantitativen Bindungsverhältnisse zwischen Agglutinin und agglutinierbarer Substanz der Bakterien; in einer daraufhin gerichteten Arbeit, die ich gemeinsam mit Dr. R. Volk publiziert habe, konnten wir durch Anwendung der Ehrlichschen Absorptionmethode über diese Fragen recht genaue Aufschlüsse erhalten. Setzt man zu einer bestimmten Menge agglutinierbarer Substanz (d. i. Bakterienaufschwemmung) eine gewisse Menge Agglutinin (d. i. spezifisches Immuserum) und dekantiert nach eingetretener Agglutination die klare obere Flüssigkeit von dem Bakterienbodensatze, so ergibt die Auswertung der oberen Flüssigkeit, daß die agglutinierbare Substanz einen Teil des Agglutinins gebunden hat, während ein anderer frei in der oberen Flüssigkeit nachweisbar ist. Nichtsdestoweniger ist die Affinität dieser agglutinierbaren Substanz für Agglutinin durchaus nicht gesättigt, trotzdem sie einen Agglutininüberschuß ungebunden ließ; setzt man nämlich

zum Bakterienbodensatze frisches Agglutinin zu, so wird neuerdings ein Teil davon gebunden. Wir sehen also, daß neben dem Reaktionsprodukt Ueberschüsse beider reagierender Substanzen nebeneinander reaktionslos verharren, trotzdem sie eine ausgesprochene Affinität für einander besitzen (bei günstigen Verhältnissen ist die Bindung selbst bei 0° schon nach 5 Stunden vollendet). Gibt man nun zu einer Einheit agglutinierbarer Substanz steigende Mengen Agglutinin, so sieht man, daß bis zu einer gewissen Höhe des Zusatzes scheinbar — wie wir später sehen werden — alles Agglutinin gebunden wird, bei noch höheren Zusätzen bleibt der oben besprochene Ueberschuß an Agglutinin ungebunden, so daß diese Einheit unter wechselnden Umständen 1—22 000 Agglutinin-einheiten binden kann (die obere Grenze gilt natürlich nur für einen besonderen Fall, bei einem höherwertigen Serum könnte sie noch höher liegen). Wenn wir dagegen nicht die absolute Bindung ins Auge fassen, sondern berücksichtigen, welchen Teil der dargebotenen Agglutininmenge die agglutinierbare Substanz gebunden hat, finden wir, daß mit steigendem Agglutininzusatz das gebundene Agglutinin einen immer geringeren Teil der zugegebenen Menge ausmacht, oder, wie wir es ausdrücken, daß der Absorptionskoeffizient dabei sinkt. Ein ähnliches Verhalten zeigt dabei die agglutinierbare Substanz; je mehr Agglutinin zugesetzt und gebunden wurde, desto mehr agglutinierbarer Substanz wird auch verankert und desto weniger nachträglich zugesetzten Agglutinins wird sie dann binden können. Steigert man die Menge der agglutinierbaren Substanz bei gleichem Zusatz an Agglutinin und unverändertem Volumen des Gemisches (d. i. steigert man die Konzentration der agglutinierbaren Substanz), so wird die Bindung des Agglutinins nicht etwa proportional gesteigert, sondern es tritt nur eine der relativen Verdünnung des Agglutinins entsprechende Vermehrung der Absorption ein (bezüglich dieses Punktes sei hier auf die betreffende Arbeit hingewiesen). Es ergibt sich also aus diesen Untersuchungen, daß nicht die absoluten Mengen der reagierenden Substanzen, sondern ihre relativen Konzentrationen den Bindungseffekt bestimmen, sodann als allgemeine Charakteristik dieser Reaktionen, daß zu Ende der Reaktion das Reaktionsprodukt sowie Ueberschüsse beider reagierender Substanzen ein System bilden, dessen Gleichgewicht erst durch neuerlichen Zusatz einer der Substanzen zerstört werden kann. Aus ihren Untersuchungen über die Bindung von Agglutinin durch die in Kulturfiltraten enthaltene agglutinierbare Substanz schließen Kraus und Pirquet in Anlehnung an die obigen Befunde, daß diese Bindung von dem relativen Verhältnisse der Filtrate zur Serummenge abhängig ist¹⁾. In weiterer Verfolgung

1) Soweit sich dies überhaupt aus den angeführten Versuchen schließen läßt. Die Versuche von Kraus, der Radziewsky ungenügende Beachtung quantitativer Verhältnisse vorwirft, lassen nach dieser Richtung recht viel zu wünschen übrig. So z. B. ist im Versuche auf p. 63 der Verlust an Agglutinin infolge Nichtberücksichtigung der Serummenge fälschlich auf 30 000 A.E. angegeben, während er in Wirklichkeit nur 3000 A.E. beträgt. Durch ungenaue quantitative Auswertung der Agglutinationsverluste wurde Kraus zu dem widersinnigen Schlusse geführt, daß die Filtrate höheren Konzentrationen gegenüber „fast kein“ (?) Agglutinin binden. Hätte Kraus genauere und rationellere Auswertungen vorgenommen, so hätte er auch Verluste finden müssen, und zwar absolut noch größere, relativ kleinere, als bei geringeren Serumkonzentrationen.

Ich möchte hier ferner bemerken, daß die Behauptung von Kraus, meine Präzipitarbeit sei als Folge seiner Untersuchungen zu betrachten, durchaus der Wahrheit nicht entspricht, indem diese Arbeit, wie jeder literaturkundige Leser wird leicht einsehen können, eine direkte Fortsetzung der Arbeit von mir und Volk sowie derjenigen von E. P. Pick über die Immunkörper bedeutet.

der oben auseinandergesetzten Befunde konnte ich in meiner Arbeit über spezifische Präzipitationsvorgänge zeigen, daß die Bindung zwischen Präzipitin und präzipitierbarer Substanz denselben Gesetzen unterliegt, wie sie oben für Agglutinin und agglutinierbare Substanz ausgeführt wurden; es erübrigt daher wohl, sie hier nochmals zu wiederholen. Nur auf einen recht wichtigen Punkt möchte ich näher eingehen; gibt man relativ viel präzipitabler Substanz (Eiweißlösung) zu einer gewissen Menge Präzipitin, so wird man bei der gewöhnlichen Untersuchungsart finden, daß das Präzipitin — scheinbar — vollständig gebunden wurde. Doch nur scheinbar, denn, wenn man ein empfindlicheres Reagens benutzt, in diesem Falle also eine noch verdünntere Eiweißlösung (konzentrierte Lösungen hemmen nämlich die sichtbare Reaktion durch Ueberschuß der präzipitablen Substanz, können also geringe Mengen Präzipitin nicht zur Geltung kommen lassen), so wird man auch hier sehr geringe Reste ungebundenen Präzipitins entdecken, die nur den gewöhnlichen Reagentien entgehen. Dasselbe gilt übrigens von der präzipitablen Substanz. Wenn man also, um kurz zu sein, von vollständiger Absorption spricht, so sollte es eigentlich, genauer gesprochen, „fast vollständige“ heißen; eine wirklich vollständige ist theoretisch überhaupt undenkbar und würde den Grundgesetzen chemischer Reaktionen widersprechen. Ebenso erklärt sich auch die „vollständige“ Absorption der Agglutinine, die vorhin erwähnt wurde. Zu ähnlichen Anschauungen über die Bindung der Präzipitine sind, unabhängig von mir, auch Linnossier und Lemoine gelangt. Auch für die Cytotoxine ergaben sich in letzter Zeit Anhaltspunkte dafür, daß dieselben Bindungsgesetze auch dort Geltung haben dürften. Außer den oben zitierten Befunden von Bordet sowie von Ehrlich und Morgenroth konnten Pfeiffer und Friedberger feststellen, daß ein und dieselbe Menge Cholera-kultur verschiedene Mengen an Immunitätseinheiten binden, je nach der zugesetzten Menge des bakteriziden Immunserums. Der interessanten Arbeit Londons über die normalen und Immunspermolysine entnehme ich folgenden Versuch, der, nach Muster des eingangs zitierten Bordetschen Versuchs angestellt, meiner Ansicht nach ganz deutlich für die Analogie dieser Bindungsgesetze mit den oben ausgeführten spricht. Verwendet wurde normales Kaninchenserum, von dem 0,05 ccm genügten, um die in 3 ccm einer gegebenen Emulsion enthaltenen Meer-schweinchenspermatozoen innerhalb ca. 4 Stunden vollständig zu immobilisieren. Wurden nun statt dessen zu 0,05 ccm Serum ebenfalls 3 ccm Emulsion, aber in 3 Teilen zu je 1 ccm, successive zugegeben, so zeigte es sich, daß die Spermatozoen der ersten zwei Portionen wohl noch vollständig immobilisiert wurden, die der dritten zeigten nur sehr geringe Beeinflussung. Dasselbe Phänomen zeigt das Röhrchen R. I No. 6, wo zu 0,1 ccm zu je 1 ccm Emulsion successive zugegeben wurde; es zeigte sich, daß diese Serummengende, die nach dem oben Gesagten 6 ccm Emulsion immobilisieren sollte (0,05—3 ccm), sich schon gegenüber dem 5. Kubikcentimeter unwirksam zeigte. Nun will zwar London für dieses Ergebnis eine andere Erklärung herbeiziehen, als die oben vertretene; er meint, daß aus den abgetöteten Spermatozoen der ersten Portionen Stoffe frei werden, die die Spermatoolyse der letzten Portionen hemmen, nachdem er tatsächlich nachgewiesen hat, daß Extrakte aus Spermatozoen (normalen!) die Spermatoolyse (Spermatozidie sollte wohl folgerichtig gesagt werden) hemmen. Ich glaube aber nicht, daß die an sich richtige und interessante Tatsache zur Erklärung der erwähnten Versuche an-

gewandt werden kann; es dürfte wohl sehr wahrscheinlich sein, daß diese hemmenden Stoffe nichts anderes sind, als die freigewordenen Rezeptoren der Spermatozoen für das Spermolysin, ähnlich wie Neisser und Shiga in Filtraten von Typhuskulturen freie Rezeptoren nachweisen konnten, die durch Verankerung des Agglutinins die Agglutination von Typhusbacillen durch Immuserum hemmen. Trifft diese Annahme zu, so ist es wohl klar, daß in unserem Falle die abgetöteten Spermatozoen keine freien Rezeptoren an die Flüssigkeit abgeben können, da ja schon der Abtötungsvorgang durch die Besetzung dieser Rezeptoren bedingt ist, um so mehr als die erste Portion der Emulsion einen Ueberschuß von Serum vorfindet. Und selbst wenn man die Annahme Londons acceptieren würde, käme sie im Zusammenhange mit obiger Ausführung wieder darauf hinaus, was ich annehme und was London bestreitet, daß nämlich die Rezeptoren der Spermatozoen verschiedene Mengen Spermolysin binden können, je nach der Konzentration, in der es ihnen dargereicht wird. Weiterhin ist es wahrscheinlich, daß auch Cytotoxine bakterieller Natur nach ähnlichen Gesetzen an die empfindlichen Zellen gebunden werden, wenigstens scheinen die von Schur exakt erhobenen quantitativen Verhältnisse bei der Hämolyse durch Staphylolysin in diesem Sinne zu sprechen. Auch ein chemisch wohldefiniertes Blutgift bietet nach den Untersuchungen von Ransom ähnliche Verhältnisse: 0,002 g Saponin lösen 0,7 ccm Hundeblood, wird dagegen das Blut successive in Raten von 0,1 ccm zugegeben, so werden nur 0,5 ccm gelöst. Aus diesem Versuche, der ein genaues Analogon des Bordetschen ist, muß man nicht nur schließen, wie Ransom dieses tut, daß das Saponin bei der Hämolyse verbraucht oder gebunden wird, sondern auch daß die Bindungsfähigkeit der Blutrezeptoren für Saponin nach der relativen Konzentration der reagierenden Substanzen wechseln kann. Experimente, in denen ich für die Agglutination der Bakterien durch Vesuvin sowie für die Fällung von Eiweißlösungen durch Pikrinsäure dieselben Bindungsgesetze nachweisen konnte, wie für die spezifischen Präzipitationsvorgänge, bilden den Uebergang zu den Färbungsvorgängen, die, wie wir seit Bordet wissen, große Analogieen mit den uns beschäftigenden Reaktionen aufweisen. Es war nun von großer Bedeutung für die Entwicklung unserer Anschauungen, daß vor ungefähr einem Jahre Heidenhain in einer wichtigen Arbeit zeigte, daß die Färbung mit Anilinfarbstoff auf einer chemischen Reaktion zwischen Farbstoff und Protoplasma beruht, sowie daß eine bestimmte Menge Eiweiß verschiedene Mengen Farbsäure binden kann. Damit war der seinerzeit von Bordet aufgestellte Vergleich zwar legitimiert, zugleich jedoch der Ansicht, daß diese beiden Vorgänge — Färbung und Bindung des Hämolysins — keine „réactions chimiques proprement dites“ (Bordet) seien, der Boden entzogen worden.

Nach alledem, was bisher gesagt wurde, wird wohl der Schluß gerechtfertigt erscheinen, daß die für die Agglutinine und Präzipitine eruierten Bindungsgesetze auf alle spezifischen Reaktionen Anwendung haben. In meiner Präzipitinarbeit sagte ich vor einem Jahre: „Dieselben Gesetze gelten auch für die Bindung zwischen Toxin und Antitoxin, eine Frage, an deren experimentelle Bearbeitung ich in nächster Zeit herantreten will“ (p. 8 des poln. Orig.). Es war ja von vornherein sehr wahrscheinlich, daß diese Körper, die so vielfache Analogieen bezüglich ihres Aufbaues und ihrer Wirkungsweise mit den oben er-

wähnten aufweisen, sich auch in dieser Hinsicht ähnlich verhalten würden. Ich bin leider bis jetzt durch äußere Umstände verhindert gewesen, diese Frage selber experimentell zu bearbeiten, doch finde ich mich durch die Arbeiten von Danysz und Bordet veranlaßt, einiges darüber vorzubringen, da diese Autoren sich dem von mir oben bezeichneten Standpunkte wohl nähern, in einigen wichtigen Punkten jedoch etwas abweichende Meinungen äußern und ich eine Diskussion über diese Punkte für prinzipiell sehr wichtig erachte. Die sehr interessante Arbeit von Danysz beschäftigt sich mit der Wirkung von Antiricin auf Ricin und zwar sowohl auf dessen agglutinierende wie auch toxische Wirkungen. Da die Arbeit bisher zu wenig Beachtung fand, sei es mir erlaubt, hier die uns interessierenden Tatsachen in ihren Hauptzügen wiederzugeben, um dann auf ihre Deutung näher einzugehen. Wird als Ausgangspunkt das glatt neutrale Gemisch 1 ccm Ricin (= 500 DLM) + 0,80 Antiricin genommen, so findet man, daß dieses Gemisch wohl ganz frei von toxischer Wirkung ist, aber zugleich deutliche antitoxische Wirkung offenbart. Das Gemisch von 1 ccm Ricin + 0,75 Antiricin ist schon etwas toxisch, indem es beim Meerschweinchen ein großes Oedem mit Induration hervorruft, dabei jedoch gleichzeitig antitoxisch, indem durch Zusatz von 1 DLM das Gemisch noch immer nicht letal wird. Das Gemisch von 1 ccm Ricin + 0,70 Antiricin tötet Meerschweinchen in 12 Tagen, nach Zusatz von 1 DLM (tötet in 4 Tagen) erst in 8 Tagen. Ein Gemisch mit einem Ueberschusse von Antiricin, und zwar 1 ccm Ricin + 0,85 Antiricin, ist atoxisch und wirkt stark antitoxisch sowohl simultan, indem es erst durch Zusatz von 100 DLM letal wird, wie auch präventiv gegen ca. 5 DLM. Wir sehen also um das sogenannte neutrale Gemisch herum eine Reihe von Gemischen, die zugleich toxisch und antitoxisch wirken. Bestimmt man die Neutralisation des Ricins für Kaninchen, so findet man, daß nicht, wie vorher, 1 ccm Ricin + 0,80 Antiricin, sondern erst 1 ccm Ricin + 0,84 Antiricin sich als neutral erweist. (Ueber ähnliche Tatsachen berichten Dreyer und Madsen.) Nicht minder interessant ist wohl der Befund von Danysz, daß Toxin-Antitoxingemische in prägnantester Weise das Bordetsche Phänomen zeigen. Folgender Versuch möge das veranschaulichen: DLM = 0,005 ccm Ricin; neutrales Gemisch: 0,1 ccm Antiricin + 0,15 ccm Ricin (= 30 DLM); der L + wird erreicht bei 0,1 ccm Antiricin + 0,40 Ricin (= 80 DLM), also D = 50 DLM. Nimmt man dagegen das dem L₀ entsprechende neutrale Gemisch und setzt den Ueberschuß von Ricin nach 24 Stunden zu, so wird schon das Gemisch (0,1 ccm Antiricin + 0,15 Ricin) + 0,05 Ricin (= 10 DLM) zum L +, unter diesen Bedingungen ist also D = 10 DLM statt 5 O. Dieselbe Erscheinung kann man beobachten, wenn man als Reagens nicht den Tierkörper, sondern die Agglutination der Kaninchenerythrocyten wählt; neutrales Gemisch: 0,2 Antiricin + 0,1 Ricin gibt keine Agglutination, 0,2 Antiricin + 0,24 Ricin vollständige; setzt man nun zu 0,2 Antiricin nicht die ganze Ricindosis auf einmal, sondern zunächst 0,1 Ricin und dann erst den Ueberschuß, so findet man, daß schon das Gemisch: (0,2 Antiricin + 0,1 Ricin) + 0,08 Ricin vollständige Agglutination gibt (also in Summa 0,18 Ricin statt 0,24). Wie im Bordetschen Versuche die Erythrocyten sich mit Hämolyisin übersättigen, so tut es hier das Ricin der zuerst zugegebenen Portion mit Antiricin, so daß später zugesetztes nur mehr eine ungenügende Menge freies Antiricin zur Neutralisation vorfindet. Umgekehrt

läßt sich zeigen, daß bei entsprechender Versuchsanordnung das Antiricin sich mit Ricin übersättigt: 15 Ricin + 10 Antiricin = L_0 , gibt man nun das Antiricin nicht auf einmal zum Ricin, sondern successive in Teildosen von je 2, so findet man, daß dann 4 solche Dosen genügen, um 15 Ricin zu entgiften, also im ganzen 8 Ricin, statt, wie vorhin, 10. Aehnliche Befunde hat nun Danysz auch für das Diphtherietoxin und Antitoxin erhoben: DiToxin DLM 0,01 ccm : $L_0 = 1$ I.E. + 0,40 ccm Toxin, L + = 1 I.E. + 0,50 ccm Toxin, D = 0,1 ccm Toxin = 10 DLM; gibt man zu 1 I.E. das Toxin in zwei Portionen successive zu, so ist schon bei (1 I.E. + 0,40 ccm Toxin) + 0,03 ccm Toxin der L + erreicht, es neutralisiert also im ersten Falle 1 I.E. bis 50 DLM, im zweiten nur bis 43 DLM. Auch beim Diphtherietoxin zeigt das neutrale Gemisch deutlich antitoxische Eigenschaften, indem es präventiv gegen 1 DLM schützt und selbst unausgeglichene Gemische, die selber toxisch wirken, offenbaren daneben noch antitoxische Eigenschaften.

Die Untersuchungen von Bordet haben die Einwirkung von Antikomplement auf das hämolytische Komplement zum Gegenstande: zunächst konnte Bordet konstatieren, daß bei der Auswertung des Antikomplementwertes das Ehrlichsche Phänomen (große Distanz zwischen L_0 und L +) deutlich zu Tage tritt. Wir haben beim Versuche folgende Konstanten: DL des Komplements = 0,05 ccm Serum, 0,3 Antikomplement + 0,2 Komplement (= 4 DL) = L_0 , 0,3 Antikomplement + 1,2 Komplement (= 24 DL) = L +, folglich D = 24 DL - 4 DL = 20 DL, d. h. in anderen Worten, daß eine Serummenge, die nur 4 DL glatt neutralisiert, erst durch Zusatz von 24 DL in seiner Neutralisationsfähigkeit erschöpft wird. Auch das von Bordet früher bei der Hämolyse beobachtete Phänomen tritt hier zu Tage: das Gemisch 0,3 Antikomplement + 0,6 Komplement löst eine gewisse Blutmenge innerhalb 105 Minuten, das Gemisch (0,3 Antikomplement + 0,5 Komplement) + 0,1 Komplement (in successiven Zusätzen) schon nach Verlauf von 60 Minuten, wirkt also stärker toxisch als das erste mit einmaligem Toxinzusatz. Das wären nun die von Danysz und Bordet erhobenen Tatsachen; welche Schlüsse in Bezug auf die Bindungsverhältnisse ziehen nun diese Forscher daraus? Nach Danysz beweisen seine Versuche „unbestreitbar, daß Toxin und Antitoxin einander in wechselnden Verhältnissen binden können. Werden sie also gemischt, so entsteht nicht etwa ein einziges Produkt, sondern es ist eine Reihe von Verbindungen möglich, in denen eine Substanz durch die andere mehr oder weniger gesättigt ist und die dementsprechend mehr oder weniger aktiv (i. e. toxisch) sind“. „Wenn also z. B. 1 ccm Ricin + 0,85 Antiricin 100 Volumen der beständigsten Verbindung geben, so erhalten wir bei 1 ccm Ricin + 0,425 Antiricin nicht etwa 50 Volumen derselben Verbindung und 50 Volumen freies Ricin, sondern 100 Volumen einer Verbindung, in der das Ricin im Vergleiche zu obiger zur Hälfte mit Antiricin imprägniert ist.“ Aehnliche Anschauungen teilt diesbezüglich auch Bordet und vertritt sie in der ihm eigenen geistreichen Weise. Mischt man Toxin mit Antitoxin „in beliebigem Verhältnisse, so wird das Antitoxin sich gleichmäßig auf alle Toxinmoleküle verteilen. Je nach den gegebenen Mengenverhältnissen wird man also verschiedene Verbindungen erhalten. Ein bestimmtes Gemisch wird natürlich nur eine einzige Verbindung enthalten, gebildet durch das Toxin, dessen Avidität für Antitoxin mehr oder weniger gesättigt sein wird. Daraus folgt, daß man in solchen Gemischen nie ganz freies,

intaktes Toxin neben vollständig durch Antitoxin gebundenem finden kann.“ Die zugleich toxischen und antotoxischen Wirkungen, die manche Gemische enthalten, sind eben der Ausdruck für den wechselnden Sättigungsgrad der jeweilig resultierenden Verbindung; je weniger gesättigt in einer Verbindung das Toxin erscheint, desto toxischer wird das betreffende Gemisch wirken, je mehr es mit Antitoxin übersättigt wird, desto deutlicher wird die antitoxische Funktion der Verbindung hervortreten. Endlich nimmt Bordet an, daß das unvollkommen gesättigte Toxin in den Gemischen auch qualitativ differente toxische Wirkungen aufweist, als das freie ungebundene Gift, und will auf diese Weise die von Ehrlich supponierten Toxonwirkungen erklärt wissen. — Wie schon oben hervorgehoben wurde, kann ich die soeben auseinandergesetzte Erklärungsweise, deren experimentelle Grundlagen ich rückhaltslos anerkenne und für eine wichtige Bereicherung unseres Wissens halte, nicht ohne weiteres acceptieren, da sie mir in mancher Hinsicht von dem durch den bisherigen Entwicklungsgang der Immunitätslehre vorgezeichneten Wege abzuweichen scheint. Den Arbeiten der letzten Jahre, unter denen diejenigen Ehrlichs und seiner Schule wohl an erster Stelle zu nennen sind, verdanken wir die für die ganze Immunitätslehre zum Hauptgrundsatz gewordene Erkenntnis, daß ein Gift nur kraft seiner Affinität zu den empfindlichen Elementen seine toxischen Wirkungen entfalten kann. Mit dieser Anschauung ist es nun meiner Einsicht nach unvereinbar, anzunehmen, wie Danysz und Bordet dies tun, daß ein Gift, das sich schon mit Antitoxin verbunden hat, noch immer toxische Wirkungen entfalten kann. Wenn Danysz und Bordet behaupten, das Antitoxin verteile sich jedesmal auf im Gemische vorhandene Toxinmoleküle, so kann die Folge davon nur die sein, daß das Gift entgiftet wird. Nähme man an, daß die Bindung des Toxins durch Antitoxin — und das nehmen ja die beiden Forscher für jedes beliebige Gemisch an — nicht gleichbedeutend ist mit der Entgiftung, dann müßte man folgerichtig wieder zur alten Annahme einer direkt zerstörenden Wirkung des Antitoxins auf das Toxin zurückkehren — das widerspräche direkt einer der Schlußthesen von Danysz — oder aber sich mit der Annahme einer undefinierten, mystischen, „neutralisierenden Kraft“ des Antitoxins begnügen. Zweitens postuliert diese Anschauung eine Vorstellung, mit der man wohl nicht leicht sich wird vertraut machen können — die Vorstellung einer chemischen Verbindung, die gleichzeitig, in derselben Menge und auf demselben Applikationswege, zwei antagonistische biologische Funktionen ausübt, eine Vorstellung, die meines Wissens ganz ohne ihresgleichen in der Chemie dastehen würde. Toxin und Antitoxin sind ja keine Körper, die uns wirklich bekannt und zugänglich sind; beides sind eben nur Funktionen, die wir, einem Bedürfnisse der Oekonomie des Denkens folgend, uns an ein körperliches Substrat gebunden denken. Wir kennen wohl Medien, an denen sie haften, kennen die Veränderungen, die sie bei diversen Einwirkungen auf diese Medien erleiden, zu allerletzt aber bleibt es doch nur die physiologische Funktion, die den Hauptinhalt unserer Begriffe von Toxin und Antitoxin ausmacht. Spricht man nun von einer Verbindung beider Körper, so kann das eben nichts anderes bedeuten, als ein Verschwinden ihrer spezifischen Funktionen unter gegenseitiger Einwirkung. Eine andere Vorstellung dürfte wenigstens bisher unserer Erkenntnis unzugänglich sein, folglich muß Verbindung zugleich auch Entgiftung bedeuten. Unvollständige Entgiftung, wie sie Danysz und

Bordet annehmen, könnte nur zweierlei bedeuten: entweder quantitativ unvollständige, dann müßte aber freies Toxin übrig bleiben, was sie bestreiten, oder aber eine labile Verbindung, die im empfänglichen Tierkörper durch die Affinität der empfänglichen Organe gesprengt werden kann, dann aber müßte man wieder eine vollständige Neutralisation in vitro annehmen, und diese ist ja für uns maßgebend. Eine Verbindung mit unvollständiger Entgiftung scheint mir eine *contradictio in adjecto* zu sein.

Im Anschlusse an das Ausgeführte möchte ich hier einige Bemerkungen anknüpfen über eine Arbeit, die bezüglich des Agglutinationsprozesses Anschauungen vertritt, die sich an die soeben analysierten eng anschließen. Im II. Teile seiner „Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination“ glaubt Joos annehmen zu können, daß je nach den relativen Mengen des Agglutinins und der agglutinierbaren Substanz, die miteinander in Verbindung treten, verschiedene Verbindungen entstehen können, die je nach dem wechselnden Grade ihrer Sättigung mit Agglutinin verschiedene Stabilität zeigen. Die Beweise jedoch, die Joos für das Bestehen solcher differenter Verbindungen anführt, dürften sich aber wohl kaum als stichhaltig erweisen; die agglutininreiche Verbindung (bei Verwendung hoher Serumkonzentrationen entstanden) soll am stabilsten sein, im destillierten Wasser am leichtesten reagglutinieren und kann angeblich „sich mit neuen Mengen agglutinierbarer Substanz vereinigen und so neue Verbindungen ergeben“ (und dennoch heißen sie sehr stabil!). Was die Reagglutination anbelangt, so genügt schon die Annahme einer größeren Menge der Verbindung, um die Bakterien leichter und schneller reagglutinieren zu lassen, wie ich in meiner Präzipitarbeit zeigen konnte. Die andere Annahme wird von Joos durch folgenden Versuch begründet: er agglutinierte dieselbe Bakterienmenge einmal mit einer geringen, das andere Mal mit einer großen Agglutininmenge, die obere Flüssigkeit wird nun entfernt und die Niederschläge in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Gibt man nun zu beiden Emulsionen eine neue Bakterienmenge, so sieht man nach einiger Zeit, daß im Röhrchen mit der geringen Agglutininmenge die frisch zugesetzten Bakterien unbeeinflusst bleiben, in demjenigen mit der großen agglutiniert werden. Die an sich richtig beobachtete Erscheinung dürfte wohl am besten dadurch zu erklären sein, daß mit Agglutinin übersättigte Bakterien an agglutininfreie oder -arme Medien einen Teil des Agglutinins wieder abgeben, d. h. daß die agglutininreiche Verbindung leicht dissoziabel ist (siehe Eisenberg und Volk. p. 166. Tabelle XI). Dieses „abgeblutete“ Agglutinin ist es, das die frisch zugesetzten Bakterien im Joosschen Versuche agglutiniert, ähnlich wie dies Morgenroth für die Hämolyse unlängst beschrieben hat. Wir kommen also zu der Ueberzeugung, daß gerade entgegen der Behauptung von Joos sein Versuch sowie die früheren Befunde von mir und Volk die agglutininreiche Verbindung als leicht dissoziabel charakterisieren. Wieso übrigens die „sehr stabile“, also sicher an den Bakterien haftende agglutininreiche Verbindung „sich mit neuen Mengen agglutinierbarer Substanz vereinigen kann“, ohne die Bakterien zu verlassen, kann ich mir schwer vorstellen. Wenn endlich Joos schon im Aussehen der verschiedenen Niederschläge — ob „mehr oder weniger schwer oder flockig“ — einen Beweis der verschiedenen Konstitution der jeweilig entstandenen Verbindungen erblicken will, so muß ich wieder daran erinnern, daß einfach quantitative

Unterschiede in der Menge der Niederschläge resp. der an den Bakterien niedergeschlagenen Substanzen solche Differenzen vollauf erklären. Vollends widersprechen muß ich auch, wenn Joos die Existenz einer „Maximalverbindung“ annimmt, in der ein Maximum von Agglutinin an die agglutinierbare Substanz gebunden ist; dieses Maximum von Agglutinin soll „so vollständig bestimmt sein, daß, wenn man noch mehr zusetzt, der Ueberschuß unverändert in der Lösung bleibt“. In der Arbeit von mir und Volk ist gezeigt worden, daß Bakterien, die schon von einer dargereichten Agglutininmenge einen ungebundenen Ueberschuß zurückgelassen haben, bei neuerlichem Agglutininzusatz weiteres Agglutinin zu binden vermögen, sowie daß die Menge des gebundenen Agglutinins immer steigt mit der Menge und Konzentration des dargereichten, daß es also überhaupt keine Maximalverbindung geben kann. Sicher ist es aber unstatthaft, das Bestehen eines Agglutininüberschusses als Zeichen für die stattgehabte maximale Sättigung anzusehen. Wie wir sehen, ist also auch in der Arbeit von Joos die Existenz einer Reihe von differenten Verbindungen durchaus nicht bewiesen¹⁾.

Die Erklärungsweise von Danysz und Bordet — um zum eigentlichen Thema zurückzukehren — ist jedoch durchaus nicht die einzig zulässige; indem ich an ihrer Stelle eine etwas abweichende vorschlage, will ich zeigen, daß sie im stande ist, die von obigen Forschern angeführten experimentellen Tatsachen folgerichtig zu erklären, daß sie ferner auch für Erklärung vieler anderer Tatsachen auf dem Gebiete der Immunität erfolgreich herangezogen werden kann, sowie endlich, daß sie es erlaubt, die Bindungsgesetze zwischen Toxin und Antitoxin im Zusammenhange mit den für andere spezifische Immunkörper erhobenen Beziehungen einheitlich aufzufassen. Vorausschicken möchte ich in voller Uebereinstimmung mit Bordet, daß meine Erklärung das sogenannte Gesetz der Multipla in keiner Weise tangiert. Dieses von Ehrlich zuerst für Ricin sowie für Diphtherietoxin, von Behring für Tetanustoxin, von Nolf für Hämagglutinin, von Joos für Bakterioagglutinin erhobene Gesetz besagt, daß, wenn man zur Neutralisation einer gewissen Menge eines spezifischen Körpers ein gewisses Minimum von seinem Antikörper braucht, zur Neutralisation der doppelten Menge auch mindestens die doppelte Menge des Antikörpers nötig ist. Dieses Gesetz — in obiger Fassung nur eine Umschreibung der einfachsten chemischen Vorstellungen — wurde leider dahin mißverstanden, als ob es die Vorstellung einer nach konstanten Proportionen verlaufenden chemischen Reaktion in sich schließen würde. Dies ist nun selbstverständlich nicht der Fall; das Gesetz besagt ja nur, daß bei relativ gleicher Konzentration beider reagierender Substanzen der gleiche Bindungseffekt eintritt, schließt jedoch nicht aus, daß bei anderen Reaktionsbedingungen die Reaktion anders verlaufen könnte. Man muß sich darüber klar werden, daß das Gesetz der konstanten und definierten Proportionen durchaus nicht mit dem Begriffe einer chemischen Reaktion zu identifizieren ist, daß es vielmehr nur für ein begrenztes Gebiet chemischer Umsetzungen zutrifft, so daß man einer Reaktion noch nicht

1) Dasselbe gilt übrigens auch von dem behaupteten Einflusse der Konzentration und der Temperatur auf die Schnelligkeit der Vereinigung der reagierenden Substanzen. Die von Joos beobachteten Tatsachen berechtigen wohl nur zu dem Schlusse, daß das Ausfallen der Verbindung, d. i. die sichtbare Reaktion von diesen Faktoren beeinflusst wird, das Eintreten der Verbindung dürfte sich in dieser Hinsicht anders verhalten, wofür man in der Arbeit von mir und Volk Anhaltspunkte finden wird.

den Charakter einer chemischen Reaktion absprechen muß, wenn man erkennt, daß sie nach unkonstanten Proportionen verläuft. Die Ver-
kennung dieser Grundsätze hat seinerzeit Bordet zu der Behauptung
geführt, die Bindung des Hämolytins an die Erythrocyten ebenso wie
die nahe verwandten Färbungsprozesse seien keine chemischen Reak-
tionen im eigentlichen Sinne des Wortes — ein Standpunkt, den der
verdiente Forscher in seiner letzten Arbeit erfreulicherweise verlassen
hat. Dagegen besitzen wir im Gesetze von Guldberg und Waage
eine allgemeine Norm, die alle reserviblen chemischen Prozesse umfaßt
und deren Feststellung im einzelnen Falle als Beweis der chemischen
Natur der betreffenden Reaktion angesehen werden kann. Das Gesetz
besagt, daß bei chemischen Umsetzungen zwischen zwei oder mehreren
Körpern nach Eintritt des chemischen Gleichgewichts das Produkt der
erzeugten Stoffmengen zum Produkte der unveränderten Stoffmengen in
einem festen Verhältnisse steht (wo als aktive Menge die in der Vol-
umeneinheit enthaltene Menge eines Körpers gilt), insofern nicht einer
der erzeugten Körper durch eine Zustandsänderung oder Unlöslichwerden
aus dem Reaktionsmedium ausscheidet, indem er dadurch einen ein-
seitigen Verlauf der Reaktion ermöglicht. Die uns interessierenden
Reaktionen gehören natürlich auch in den Geltungsbereich dieses Ge-
setzes: ihre chemische Natur dürfte wohl nach den Errungenschaften
der letzten Jahre über jeden Zweifel erhaben sein. Für die Reversibi-
lität dieser Prozesse scheinen viele Tatsachen zu sprechen; die Unter-
suchungen von Morgenroth beweisen, daß die Verbindung zwischen
Erythrocytenrezeptor und hämolytischem Zwischenkörper hydrolytischer
Dissoziation zugänglich ist. Was die Verbindung zwischen Agglutinin
und agglutinierbarer Substanz anbelangt, konnte ich mit Volk beob-
achten, daß Bakterien, die eine größere Agglutininmenge gebunden
hatten, nach Dekantierung der oberen Flüssigkeit und Uberschichtung
mit physiologischer NaCl-Lösung an dieses Milieu meßbare Agglutinin-
mengen abgaben und zwar nicht einmal, sondern mehrere Male hinter-
einander, wenn jedesmal die Flüssigkeit erneuert wurde. Für die Mög-
lichkeit der Dissoziation der Toxin- und Antitoxinverbindung sprechen
die bekannten Versuche von Calmette mit Schlangengift, von Wasser-
mann mit Pyocyaneus-Gift, in denen unter dem Einflusse einer
höheren Temperatur ein neutrales Toxin-Antitoxingemisch toxisch wurde;
dabei wird wahrscheinlich durch die höhere Temperatur die Verbindung
dissoziiert und das thermostabilere Antitoxin zerstört, während das
resistentere Toxin erhalten bleibt. Man könnte vielleicht den Einwand
machen, daß im Falle der Agglutination sowie der Präzipitation die
resultierende Verbindung, indem sie niedergeschlagen wird, den Verlauf
der Reaktion einseitig beeinflussen könnte. Das trifft jedoch nicht zu;
wissen wir ja durch die Untersuchungen von Bordet und Joos, daß
die Ausfällung der Verbindung eine sekundäre Erscheinung ist, die mit
der Bindung beider Substanzen nichts zu tun hat und nur von der
Gegenwart gewisser Salze (richtiger Ionen) im Medium bedingt wird,
sowie daß die chemische Verbindung auch dort eintreten kann, wo die
Bedingungen für die Ausfällung fehlen. Andererseits zeigt das Experi-
ment, daß die ausgefällte Verbindung doch noch dissoziationsfähig ist,
wodurch das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes in obenerwähntem
Sinne ermöglicht wird. Ein weiterer Einwand gegen die vorgebrachte
Erklärungsweise ließe sich vielleicht aus einer oberflächlichen Auffassung
des Bordetschen Versuches konstruieren; wir sahen nämlich, daß,

wenn wir zu einer bestimmten Serummenge eine gewisse Menge Blut auf einmal zusetzen, die ganze Blutmenge gelöst wird, daß dagegen bei successivem Zusatz ein Teil dieser Menge ungelöst bleibt. Man könnte also vielleicht aus diesem Versuche den Schluß ziehen, daß durch Einwirkung identischer Mengen zweier Körper zwei differente Gleichgewichtszustände erreicht werden können, je nach den Phasen, die in beiden Fällen die Reaktion durchgemacht hat — ein Schluß, der dem Guldberg-Waageschen Gesetz direkt zuwiderlaufen würde. Dieser Widerspruch ist aber nur scheinbar. Im Bordetschen Versuche interessiert uns vor allem die Bindungsreaktion zweier Körper, die Hämolyse gibt dafür nur einen rein äußerlichen Ausdruck her. Die Bindung des Hämolysins an einen gewissen Bestandteil der Erythrocyten ändert die darin bestehenden osmotischen Verhältnisse in der Weise, daß das Hämoglobin aus dem Erythrocyten austritt; dieses osmotische Phänomen ist seiner Natur nach irreversibel und erfolgt schon, wenn nur ein geringer Anteil der Hämolysinrezeptoren des Erythrocyten besetzt wurde. Im ersten Falle also, wo die ganze Blutmenge auf einmal zugesetzt wird, besetzt das Hämolysin an jedem Erythrocyten nur einen geringen Teil seiner Rezeptoren und wird dabei erschöpft; im anderen Falle dagegen binden die Erythrocyten der ersten Portionen fast das gesamte vorhandene Hämolysin, wobei ein beträchtlicherer Teil ihrer Rezeptoren besetzt wird, als im ersten Falle. Der resultierende Bindungseffekt bleibt in beiden Fällen derselbe, nur ist die Verteilung der Verbindung verschieden, im ersten Falle gleichmäßig in der ganzen Blutmenge, im anderen ist die ganze Masse der entstandenen Verbindung in den Erythrocyten der ersten Portionen aufgespeichert, so daß der Zustand der Blutaufschwemmung nicht als direktes Maß der quantitativen Bindungsverhältnisse gelten kann.

Es ist nun höchst plausibel, anzunehmen, daß auch die uns interessierenden Bindungsgesetze zwischen Toxin und Antitoxin ähnlich wie die anderer spezifischer Körper in dieselbe Kategorie gehören. Man hätte sich dann vorzustellen, daß, wenn gewisse Mengen Toxin und Antitoxin zusammengebracht werden, neben dem Reaktionsprodukte — der nach meiner Ansicht vollkommen neutralen Verbindung — ungebundene Ueberschüsse beider Substanzen in wechselnden Mengen übrig bleiben, die einander nicht weiter beeinflussen. Der Unterschied zwischen dieser Anschauung und der von Danysz und Bordet vertretenen braucht wohl nicht hervorgehoben zu werden; dort erhalten wir eine Verbindung der gesamten Mengen der Substanzen, die im Gemische vorhanden waren, eine Verbindung, deren Eigenschaften durch das Mengenverhältnis ihrer Komponenten bedingt wird, hier eine vollkommen neutrale Verbindung mit Ueberschüssen von freiem Toxin und Antitoxin. Je nach den relativen Konzentrationen der reagierenden Substanzen kann die Reaktion in verschiedener Richtung verlaufen; bei starker Konzentration der einen wird die Bindung der anderen eine fast vollständige sein können und der Ueberschuß im Verhältnisse zur ursprünglichen Menge ein verschwindend kleiner; bei relativ starker Konzentration der anderen Substanz wird ein umgekehrtes Verhalten zu erwarten sein. Bei Verwendung ein und derselben Menge der einen Substanz werden verschiedene Mengen der anderen gebunden werden können, je nach der Konzentration dieser Substanz. — Wie stimmt nun diese Erklärung zu den durch Experiment wie durch Erfahrung erhobenen Tatsachen? Da wir die Körper, um deren Reaktionen es sich hier handelt, eigentlich

gar nicht kennen und als einzige Charakteristik dafür ihre biologische Wirkung verwenden müssen, wird es leicht begreiflich erscheinen, daß man bei der Deutung der experimentellen Befunde besondere Vorsicht wird walten lassen müssen. Der lebende Tierkörper, der dabei die Rolle des Reagens auf Toxin und Antitoxin spielt, ist ein gar komplizierter Mechanismus, in dem mannigfaltige biologische Faktoren die von uns studierte Reaktion nach verschiedenen Seiten hin und in verschiedenem Maße beeinflussen können. Die Hauptbedingung für ein chemisches Reagenz — die absolute Gleichmäßigkeit und Konstanz der Reaktionsweise — wird sowohl durch individuelle Unterschiede wie durch physiologische als auch pathologische Prozesse im Organismus stark beeinträchtigt. Eine auch nur halbwegs acceptable Konstanz ist nur in sehr wenigen Kombinationen und auch hier nur innerhalb enger Grenzen exakt eingehaltener, vielfacher Versuchsbedingungen zu erzielen. Um sicht- und meßbare Wirkungen im Tierkörper hervorzubringen, muß ein Toxin in einer gewissen Menge wirken, darunter bleibt es unserer Erkenntnis unzugänglich, indem die natürlichen Widerstandskräfte des Organismus seine Existenz verdecken. Von dem Maße dieser Widerstandskräfte sowie von anderen Schwankungen des cellulären wie humoralen Chemismus wird die Empfindlichkeit dieses Reagens in hohem Grade beeinflusst werden können. Der Gehalt des Blutes an präformierten Antitoxinen, celluläre Ueber- und Unterempfindlichkeit werden darüber entscheiden, welche geringste Menge des Toxins sich noch durch eine pathogene Wirkung wird offenbaren können. In besonders günstigen Fällen wird es möglich sein, noch kleinere Toxinmengen, denen toxische Effekte abgehen, durch etwaige immunisierende Wirkungen sichtbar zu machen. Noch viel komplizierter müssen sich naturgemäß die Bedingungen für den Nachweis des Antitoxins gestalten, da wir hier außer dem lebenden Organismus noch auch die Toxinwirkung zu berücksichtigen haben. Dies vorausgeschickt, wenden wir uns nun zur Untersuchung der Wirkungen von Toxin- und Antitoxingemischen. Nach dem oben Gesagten ist es selbstverständlich, daß es in Wirklichkeit kein neutrales Gemisch geben kann, da immer ein gewisser, wenn auch noch so kleiner, Ueberschuß von Toxin vorhanden sein muß. Ich kann aber Bordet nicht beipflichten, wenn er behauptet, es gäbe keine wirkliche Neutralisation des Toxins, nur eine größere oder geringere Abschwächung je nach dem Grade der Sättigung durch Antitoxin; wie schon auseinandergesetzt wurde, glaube ich nicht, daß man die Annahme einer solchen unvollkommenen Neutralisation mit der einer chemischen Bindung, die doch sowohl von Danysz wie auch Bordet acceptiert wird, vereinigen kann. Wenn wir in der Praxis von völliger Neutralisation sprechen, so bedeutet das nur, daß der Ueberschuß von Toxin im gegebenen Gemisch im Tierexperiment unter gewissen Bedingungen nicht mehr zur Geltung kommt. Ein solches Gemisch ist in Wirklichkeit mit Antitoxin übersättigt und wir sehen tatsächlich die antitoxische Wirkung des Antitoxinüberschusses in den Versuchen von Danysz klar hervortreten. Unsere Anschauung macht es auch erklärlich, daß es Gemische gibt, die gleichzeitig toxische und antitoxische Wirkungen entfalten; ja noch mehr, theoretisch müßte es eigentlich jedes Gemisch tun, nur sind zuweilen die Toxin- resp. Antitoxinüberschüsse zu gering, um nachgewiesen werden zu können. Ich glaube auch, daß diese Erklärung wohl am besten und klarsten die von Danysz und Bordet gefundenen Tatsachen ausdrückt: was wir sehen, ist, daß die Toxin-Antitoxingemische

entweder toxische oder antitoxische oder auch beide Wirkungen zugleich entfalten. Nun setzen wir für die toxische Funktion ihr Symbol — den hypothetischen Körper „Toxin“ — für die antitoxische das ebenfalls hypothetische „Antitoxin“ — und wir kommen zu den Toxin-Antitoxinüberschüssen — zu einer Erklärung, die auf allgemeinen chemischen Gesetzen basiert, statt unsere Zuflucht zu einem mysteriösen Körper zu nehmen, der zu gleicher Zeit zwei antagonistische Funktionen ausübt. Den Beweis der Existenz eines solchen Körpers will Bordet darin erblicken, daß die toxische Wirkung nicht ganz neutraler Gemische qualitativ anders sein soll, als die entsprechend verdünnter reiner Giftdosen. Vergleicht man ein Antikomplement-Komplementgemisch mit einer schwachen Dosis Komplement in Bezug auf ihre hämolytische Wirkung, so findet man, daß das reine Komplement rascher wirkt, daß jedoch das Gemisch innerhalb einer längeren Zeit eine viel größere Menge Blut zerstören kann. Die von Bordet gegebene Erklärung der zweifellos interessanten Erscheinung ist jedoch nicht die einzig mögliche; sie könnte ja ebensogut auf eine langsam vor sich gehende Dissoziation der Antikomplement-Komplementverbindung zurückgeführt werden, ähnlich wie sie Morgenroth bei der Hämolyse, ich und Volk bei der Agglutination gesehen haben. Die Bedingungen zu einer solchen Dissoziation werden sich im Bordetschen Versuche leicht einstellen können; wir haben im Gemische die Komplement-Antikomplementverbindung und daneben einen Komplementüberschuß. Die zugesetzten immunkörperbeladenen (sensibilisierten) Erythrocyten werden das freie Komplement sogleich verankern, wodurch das Medium sofort komplementarm wird und die Bedingungen zur Dissoziation eintreten und zwar zu einer andauernden Dissoziation, indem der jedesmal freigewordene Komplementanteil von den im Ueberschusse vorhandenen Erythrocyten abgefangen wird und dadurch das Milieu dauernd komplementarm bleibt. Die oben ausgesprochene Annahme, daß es in Wirklichkeit kein wirklich neutrales Gemisch geben kann, findet ihre Stützen in gar manchen Tatsachen, die in den letzten Jahren experimentell erhoben wurden. Die Versuche von Danysz sowie Bordet zeigen, daß solche Gemische deutlich antitoxisch wirken, was mit unserer Erklärung, daß solche Gemische, um im Tierexperimente neutral zu erscheinen, mit Antitoxin übersättigt sein müssen, gut übereinstimmt. Der jedenfalls äußerst geringe Toxinüberschuß in solchen Gemischen ist unter gewöhnlichen Versuchsbedingungen nicht nachweisbar — das drücken wir ja in der Bezeichnung „neutral“ aus — wird jedoch entweder die Giftempfänglichkeit des Tieres gesteigert oder zur Wertbestimmung ein empfindlicheres Reagens in Form einer empfänglicheren Tierspecies verwendet oder aber der Toxinüberschuß größer, so kommt auch diese kleine Toxinmenge zur Geltung. Dzierzowski, der mit solchen neutralen Diphtherietoxin-Antitoxingemischen 4 Ziegen, 2 Hunde und 2 Pferde immunisierte, gibt an, in keinem Falle eine Antitoxinproduktion konstatiert zu haben. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß bei den betreffenden Tieren die verschwindend kleinen Toxinüberschüsse in solchen Gemischen keine Reaktion haben auslösen können; da wir jedoch wissen, daß die Reaktionsweise der Tiere von ihrer Individualität in hohem Grade bestimmt wird, wundert es uns kaum, daß Kretz, der 2 Pferde mit solchen Gemischen immunisierte, bei einem derselben ein 3-fach normales Serum erlangen konnte (Donar), also jedenfalls eine, wenn auch geringe Reaktion des Tieres auf die eingeführten Toxinüberschüsse (unter

250 normalen Pferden, die Dzierzowski auf ihren Antitoxingehalt untersuchte, fand er als höchsten Wert einmal ein 2-fach normales Serum). Viel prompter werden natürlich auf solche minimale Giftüberschüsse überempfindliche Tiere reagieren können und dementsprechend fand auch Kretz, daß solche Tiere die Injektion von glatt neutralen (sogar überkompensierten) Gemischen mit beträchtlicher Antitoxinproduktion beantworten. Ebenso also wie geringe Toxindosen, die für normale Tiere noch unschädlich sind, bei solchen Tieren toxische Erscheinungen hervorrufen, sind minimale Toxinüberschüsse, die bei normalen Tieren für gewöhnlich keine Reaktion hervorrufen, für solche Tiere nicht irrelevant. Jedenfalls ist die Wirkung freien Toxins unentbehrlich zur Erklärung dieser höchst wichtigen Tatsache; während nun für mich die Existenz dieses freien Toxins als einfache Folge der Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin erscheint, nimmt Kretz, ein Anhänger der Giftneutralisationstheorie, nach konstanter Proportion an, daß die empfindlichen Elemente im Organismus der überempfindlichen Tiere auf Grund ihres vermehrten Rezeptorengehaltes eine erhöhte Giftavidität besitzen und dadurch befähigt sind, die neutrale Verbindung zu sprengen und das freigewordene Toxin an sich zu reißen. Gegen diese Anschauungsweise lassen sich jedoch manche Bedenken erheben; es ist nicht zu bestreiten, daß Rezeptoren verschiedener Tierspecies demselben Gifte gegenüber verschiedene Aviditätsgrade aufweisen können, so daß die Verbindung des Giftes mit den Rezeptoren der einen Species durch die höhere Avidität der Rezeptoren der anderen gegebenen Falles gesprengt werden könnte, es wird jedoch schwer fallen, sich die Möglichkeit einer solchen Sprengung vorzustellen in dem Falle, wo beide Arten von Rezeptoren identisch sind. Andererseits sind wir nicht berechtigt, anzunehmen, daß Rezeptoren in höherer Konzentration eine höhere Giftavidität besitzen, also solche in geringerer Konzentration, daß sie dadurch im stande waren, eine schon bestehende Verbindung zu sprengen. Hätten wir freies Toxin vor uns und einerseits Giftrezeptoren in hoher Konzentration, andererseits ebensolche in geringerer, dann könnten wir uns wohl vorstellen, daß die ersteren dank ihrer größeren Reaktionsgeschwindigkeit das Toxin größtenteils an sich reißen werden, doch kann die größere Reaktionsgeschwindigkeit einer schon bestehenden Verbindung gegenüber unmöglich etwas ausrichten. In unserem Falle, wo wir einem Pferde durch Pferdeantitoxin neutrales Gift injizierten, haben wir folglich keinen Anhaltspunkt zu der Annahme, daß die Toxin-Antitoxinverbindung gesprengt und ein Anteil des Toxins frei werden könnte. Endlich möchte ich noch bemerken, daß, wenn wir auch in Uebereinstimmung mit Cobett und Kretz bei überempfindlichen Tieren das Bestehen eines Rezeptorenüberschusses an den empfänglichen Zellen annehmen können, wir noch nicht behaupten dürfen, daß die Konzentration dieser Zellrezeptoren größer ist als diejenige der Antitoxine im Blute dieser hochimmunisierten Tiere, wie das von Kretz angenommen wird. Daß auch aus anderen Ursachen entstandene nicht spezifische Giftüberempfindlichkeit den Nachweis von Giftüberschuß in anscheinend neutralen Gemischen ermöglichen kann, zeigen die bekannten Versuche von Roux und Vaillard, wonach Gemische von Tetanustoxin und Antitoxin, die von normalen Meerschweinchen reaktionslos absorbiert werden, bei Tieren, die einige Zeit zuvor gegen den V. Massauah immunisiert wurden und anscheinend völlig gesund waren, typischen Tetanus hervorriefen. Ebenso dürften wohl die neuer-

dings publizierten interessanten Experimente von Marenghi zu erklären sein, in denen Meerschweinchen, denen beide Nebennieren abgetragen wurden, sich dem Diphtheriegifte gegenüber überempfindlich erweisen und auf Injektion von streng neutralen Gemischen eingehen. Es gelingt weiter, durch die Wahl einer geeigneten Tierart zu zeigen, daß Gemische, die, an einer anderen Species geprüft, neutral erscheinen, doch einen nicht zu vernachlässigenden Toxinüberschuß enthalten können; je empfänglicher eine Species für das betreffende Gift ist, ein desto feineres Reagens für solches überschüssige Gift wird sie abgeben können. So erzeugten in den vielumstrittenen Versuchen Buchners Gemische von Tetanustoxin und Antitoxin, die für Mäuse neutral oder fast neutral waren, bei den empfänglicheren Meerschweinchen typischen Tetanus. Ebenso sehen wir oben in den Experimenten von Danysz, daß für Meerschweinchen neutrale Ricin-Antiricinigemische es für Kaninchen nicht sind. In ähnlicher Weise rufen Diphtherietoxin-Antitoxinigemische, die für Meerschweinchen glatt neutral sind, bei Kaninchen toxische Wirkungen hervor, wie das seiner Zeit von Roux und Martin zuerst beschrieben und neuerdings auf Grund exakter Bestimmungen von Dreyer und Madsen bestätigt wurde. Selbstverständlich wird die Größe der Wirkung solcher Gemische auch von der absoluten Größe der Ueberschüsse abhängen: während nun bei Toxin-Antitoxin die sogenannten neutralen Gemische mit Antitoxin übersättigt sein dürften und deshalb der Toxinüberschuß so schwer nachweisbar erscheint, scheint dies bei analogen Versuchen, die von verschiedenen Seiten mit agglutinierten Bakterien sowie mit immunkörperbeladenen Erythrocyten angestellt wurden, nicht immer der Fall gewesen zu sein. Die betreffenden Untersucher gingen von der Voraussetzung aus, daß, wenn tatsächlich die haptophore Gruppe der spezifischen Körper es ist, die im empfänglichen Organismus die Bildung der Antikörper veranlaßt, daß dann nach Verankerung dieser Gruppe in vitro die betreffenden Körper die Fähigkeit verlieren sollten, Antikörperproduktion anzuregen. Während nun v. Dungern bei Injektion von immunkörperbeladenen Erythrocyten tatsächlich keine Hämolyseproduktion auftreten sah, fand Sachs in einer ähnlichen Versuchsanordnung unter 8 Versuchen nur 3mal dieses Resultat, während in 5 Versuchen eine Produktion von Immunkörpern, wenn auch in geringerer Menge als bei Kontrolltieren, beobachtet werden konnte. Aehnliche Ergebnisse hatten Rehns, Nicolle und Trénel sowie Neisser und Lubowski bei ihren Versuchen mit agglutinierten Bakterien. Sachs glaubte, durch den Nachweis von Immunkörperüberschüssen bei der Bereitung seines Injektionsmaterials zu der Annahme berechtigt zu sein, „daß alle Rezeptoren gesättigt waren“, was durchaus nicht der Fall sein muß: hatte doch Ehrlich in seinem oben angeführten Versuche gezeigt, daß eine gewisse Blutmenge, die schon bei Zusatz von 60 lösenden Dosen einen freien Ueberschuß ungebunden ließ, bei größerem Immunkörperzusatz auch 99 solche Dosen binden konnte. Auch Neisser und Lubowski bestrebten sich, bei der Herstellung der agglutinierenden Bakterien dieselben „mit dem Agglutinin völlig abzusättigen“. Doch selbst bei ihrer sehr zweckentsprechenden Versuchsanordnung (2malige successive Sättigung mit großen Agglutindosen) konnten sie keine Gewähr haben, die betreffenden Rezeptoren tatsächlich verstopft zu haben; hat es sich doch in den Versuchen von mir und Volk gezeigt, daß selbst Bakterien, die noch viel größere Agglutininmengen absorbiert hatten (22 000 A.E. statt der hier gebrauchten

1000) bei nochmaligem Agglutininzusatz noch immer beträchtliche Agglutininmengen absorbieren konnten. Die einzig rationelle Kontrolle bei all diesen Versuchen wäre nur die gewesen, zu zeigen, daß die betreffenden verstopften Elemente tatsächlich nicht mehr im stande sind, den entsprechenden Immunkörper zu binden; war diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen, so konnten sie im Tierkörper verankert werden und die spezifischen Reaktionen auslösen. Als besonders demonstrativ in dieser Richtung möchte ich die schönen Untersuchungen von Pfeiffer über die immunisierenden Wirkungen von immunkörperbeladenen Cholera-vibrionen anführen; speziell beweiskräftig scheinen mir die Versuche, wo Kaninchen Cholera-vibrionen intravenös injiziert wurden, die mit Kaninchenimmunkörpern beladen waren und in denen ganz beträchtliche Immunkörperproduktion erzielt wurde. In diesen Versuchen wird es wohl schwer fallen, etwa eine Spaltung der Verbindung Bakterien-rezeptor-Immunkörper anzunehmen, da wir keinen Grund haben, an den Gewebsrezeptoren eine so hohe Avidität anzunehmen, daß eine solche Spaltung eintreten könnte. Es ist andererseits nicht zu verwundern, daß bei Verwendung von Kulturfiltraten, die relativ wenig Rezeptoren enthalten dürften, durch Zusetzen eines großen Immunkörperüberschusses die Zahl der freibleibenden Rezeptoren so herabgedrückt wird, daß sie im Tierkörper meistens keine meßbare Reaktion mehr auslösen können; doch auch hier kann es vorkommen, daß bei einem oder dem anderen Tiere Immunkörper auftreten (s. Pfeiffer, p. 893. Tab. V B. Tier No. 4). Selbstverständlich wird dabei die individuelle Fähigkeit der Versuchstiere, auf geringe Mengen von spezifischen Körpern mit Immunkörperproduktion zu reagieren, eine große Rolle spielen, was wir sowohl in den Versuchen von Pfeiffer, Sachs, wie von Neisser und Lubowski bestätigt finden. Nach obigem wird wohl die Annahme von Sachs, „daß gewisse Tiere die individuelle Fähigkeit haben, die besetzten Rezeptoren trotzdem zu verankern“, kraft der „höheren Avidität ihrer Gewebsrezeptoren“ zur Erklärung der von ihm gefundenen Tatsachen überflüssig erscheinen müssen. Hier wird es vielleicht noch am Platze sein, die Versuche von Selinow zu erwähnen, die ebenfalls für ein Bestehen von Toxin- und Antitoxinüberschüssen in den Gemischen dieser Körper zu sprechen scheinen. Dieser Forscher injizierte Diphtherietoxin resp. Antitoxin in das Kornealgewebe und konstatierte nach Verlauf einiger Tage für jeden dieser Körper charakteristische histologische Veränderungen. Injizierte er nun ein Gemisch, in dem das Toxin nur zur Hälfte mit Antitoxin gesättigt war, so konnte er neben den vom Toxin herrührenden Veränderungen auch solche finden, die auf die Wirkung von Antitoxin zurückzuführen waren.

Während uns bisher das Schicksal des *in vitro* bewerkstelligten Toxin-Antitoxingemisches beschäftigte, wollen wir uns nunmehr zur Betrachtung der Verhältnisse wenden, die eintreten, wenn beide Körper im lebenden Organismus zusammentreffen. Während im ersten Falle nach den uns jetzt geläufigen Vorstellungen die chemische Umsetzung schon *in vitro* vor sich geht und der Organismus nur einen Indikator abgibt für etwaige Ueberschüsse beider Substanzen, kann im zweiten Falle die Reaktion selbst von ihrem lebenden Milieu in verschiedener Weise in ihrem Ablaufe beeinflusst werden, wir müssen uns also im vorhinein auf kompliziertere Verhältnisse gefaßt machen. Tatsächlich kennen wir ja verschiedene Beispiele, in denen diese Reaktion im lebenden Körper ganz anders abläuft als *in vitro*; es sei hier nur hingewiesen auf das Aus-

bleiben der Agglutination von Cholera bacillen im immunen Tiere (Taurilli-Salimbeni), das Ausbleiben der Hämagglutination nach Injektion von normalen (Bongiovannini) oder Immunhämagglutininen (Kraus und Sternberg) oder von vegetabilischen Toxalbuminen (Lau), endlich das Ausbleiben von Präzipitation nach Injektion von Eiweiß bei einem dagegen immunisierten Tiere (Rostoski). Die Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin im Tierkörper wird nun beobachtet, wenn Toxin entweder einem normalen oder einem immunisierten Tiere einverleibt wird. Bekanntlich besitzen ja verschiedene Tierspecies diverse normale Antitoxine in ihrem Blute; was speziell das bestbekannte Gebiet der Diphtherieimmunität betrifft, wissen wir aus den Untersuchungen von Roux und Martin, Cobbett, Meade Bolton und Dzierzowski, daß normale Pferde in ihrem Blute nachweisbare Antitoxinmengen beherbergen, deren Werte z. B. nach Cobbett zwischen $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{100}$ A.E. pro 1 ccm, nach Dzierzowski zwischen $\frac{1}{100}$ —2 A.E., schwankt. Injiziert man nun so einem Tiere, das in seinem Blute 200—2000 A.E. besitzt, selbst die hohe Dosis von einigen Kubikcentimetern Toxin, die zur glatten Neutralisierung einige A.E. bedürfen, so sollte die Injektion am Tiere reaktionslos vorbeigehen, wenn eine solche volle Neutralisation wirklich einträte. Und dennoch sehen wir, daß die Dosis immunisierend wirkt oder aber — bei besonders empfindlichen Tieren — bedrohliche toxische Erscheinungen hervorrufen kann, die zuweilen sogar letal ablaufen. So sind im Krakauer serotherapeutischen Institute des Herrn Prof. Bujwid zwei Pferde nach Injektion von 2 resp. 5 ccm Toxin eingegangen, und Dzierzowski erwähnt ein Pferd (No. 57), bei dem die Injektion von 4 ccm Toxin = 40 DLM eine letale Intoxikation zur Folge hatte¹⁾. Ganz ähnliche Verhältnisse, wie soeben auseinandergesetzt, treten bei jedem immunisierten Tiere mit jeder neuen Giftinjektion ein. Die injizierte Giftmenge bildet hier nur einen kleinen Bruchteil derjenigen, die durch das im Tiere kreisende Antitoxin neutralisiert werden könnte, und dennoch bewirkt jede neue Giftinjektion eine Steigerung des Antitoxingehaltes und muß folglich eine gewisse Giftmenge zur Wirkung gelangen. Als erster hat meines Wissens auf diesen Punkt Kretz hingewiesen, ohne vorläufig eine Erklärung dafür geben zu können; sodann hat Pfeiffer diese Frage mit Rücksicht auf die bakterizide Immunität berührt, und erst vor kurzem hat v. Dungern die Forderung ausgesprochen, daß bei einem gegen Eiweiß immunisierten Tiere bei einer erneuten Injektion trotz des kreisenden Präzipitinüberschusses freie präzipitabile Substanz zur Wirkung gelangen müsse, wenn neuerliche Präzipitinproduktion eintreten soll. Der einzige, der bisher meines Wissens für diese für die ganze Immunitätslehre grundlegende Tatsache eine Erklärung zu geben versucht hat, ist Dzierzowski. Dieser verdiente Forscher nimmt an, daß das subkutan injizierte Toxin vermöge des schwachen Antitoxingehaltes im subkutanen Gewebe nur zum Teil neutralisiert wird und daß der durch Antitoxin nicht gebundene Teil, von den Zellen der Subcutis lokal verankert, zur Antitoxinproduktion Anlaß gibt. Das in die Blutbahn resorbierte Toxin ist nach Dzierzowski für die Immunisierung belanglos, da es dort vollständig neutralisiert wird, ebenso kann

1) Auf diesen Umstand hat mich mein verehrter Chef, Herr Prof. O. Bujwid, aufmerksam gemacht, dem ich dafür meinen verbindlichsten Dank auch an dieser Stelle auszusprechen mir erlaube.

es auf diesem Wege nicht an andere Gewebelemente gelangen, nachdem es ja unterwegs der Neutralisation unterliegt. Folgerichtig behauptet weiter Dzierzowski, daß nach intravenöser Gifteinverleibung keine Antitoxinproduktion beobachtet werden sollte, da doch das jeweilig injizierte Toxin jedesmal in der Blutbahn mit Antitoxin zusammentreffen und neutralisiert werden muß. Die soeben skizzierte Anschauung, die in einzelnen Punkten wohl richtig sein dürfte, ist jedoch nicht im stande, alle beobachteten Tatsachen zu erklären und findet zum Teil in manchen eine direkte Widerlegung. Es ist ja wohl anzunehmen, daß im subkutanen Gewebe nach einer Giftinjektion die Neutralisationsbedingungen für das Gift weniger günstig sind, als etwa im Blute, man darf jedoch nicht vergessen, daß auch dieses Gewebe Antitoxin enthält, daß darin ein Netz von Blut- und Lymphgefäßen sich ausbreitet, in dem konzentriertes Antitoxin zirkuliert, sowie endlich daß infolge des durch die Giftinjektion gesetzten Reizes eine antitoxinreiche Exsudation stattfindet — lauter Bedingungen für die Neutralisation des Giftes selbst in der Subcutis. Und wie wäre dann die oben erwähnte letale Wirkung kleiner Toxindosen bei normalen oder bei hochimmunen überempfindlichen Tieren? Dzierzowski wird wohl kaum annehmen wollen, daß die Verankerung einer kleinen Toxindosis im subkutanen Gewebe den Tod des Tieres zur Folge haben kann — und doch kann ja nach seinen Anschauungen das Toxin auf dem Blutwege nicht an die lebenswichtigen Elemente gelangen, da es unterwegs neutralisiert werden müßte. Endlich stimmt die Behauptung, daß durch intravenöse Giftzufuhr keine Immunisierung zu erlangen ist, durchaus nicht mit den Tatsachen überein; führt doch Dzierzowski selber in seinen Protokollen die Geschichte des Pferdes No. 163 (p. 359) an, daß nach 9 intravenösen Giftinjektionen (die noch in ihrer Wirkung durch gleichzeitige Antitoxineinspritzung abgeschwächt wurden!) ein 20-fach normales Serum aufwies. Ebenso zeigte Pferd No. 43 in der ersten Mitteilung von Dzierzowski nach intravenöser Giftapplikation ein 70-fach normales Serum. In der Arbeit von Kretz finden wir ebenfalls das Pferd Demagog erwähnt, das nach intravenöser Gifteinverleibung (trotz gleichzeitiger Antitoxininjektionen!) einen Antitoxinwert von 20 A.E. in 1 ccm erlangt hat. Es dürfte also als feststehend angenommen werden, daß auch nach intravenöser Giftzufuhr Antitoxinproduktion eintritt, freilich eine geringere, als nach subkutaner. Angesichts dieser Tatsache erweist sich natürlich die Ansicht von Dzierzowski als unzulänglich, und wenn dieser Autor nun behauptet, „die in diesen Experimenten auftretende geringe Antitoxinproduktion sei auf eine unvollständige Neutralisation des Giftes in der Blutbahn von seinem Eintritte in die Gewebe und Organe zurückzuführen“, so ist das vom Standpunkte der Ehrlich'schen Theorie von den konstanten Bindungsproportionen, zu der sich Dzierzowski bekennt, eine Inkonsequenz, denn es sind wohl in diesem Falle, angesichts des großen Antitoxinüberschusses im Blute, die besten Bedingungen für eine vollständige Giftneutralisation gegeben. Die einzige Anschauungsweise, die im stande ist, diese Tatsachen zu erklären, ist meines Erachtens die oben vertretene Auffassung der Bindungsgesetze zwischen Toxin und Antitoxin. Wenn wir annehmen, daß bei jeder Toxin-Antitoxinreaktion ein Teil des Giftes ungebunden bleibt, so wird dieser Giftüberschuß bei normalen wie bei immunisierten Tieren seine spezifischen Wirkungen entfalten können, und zwar toxische oder immunisierende, je nach den biologischen Bedingungen des gegebenen

Falles. Unumgänglich erscheint diese Annahme in dem nahe verwandten Falle der bakteriziden Immunität, wo wir aus den Untersuchungen von Pfeiffer und Marx sowie Wassermann wissen, daß die Bildung der Immunkörper in den blutbildenden Organen erfolgt; soll nun bei einem immunen Tiere bei einer neuerlichen Injektion Immunkörperproduktion von neuem vor sich gehen, so müssen die Bakterienrezeptoren auf dem Blutwege in die Organe gelangen, d. i. es muß trotz der großen Immunkörpermenge im Blute ein freier Ueberschuß an Bakterienrezeptoren zur Wirkung gelangen. Diese freien Ueberschüsse an Gift resp. Bakterienrezeptoren wird man sich als äußerst gering vorzustellen haben; daß sie dennoch so prägnante immunisierende Effekte hervorrufen, wird auf die Ueberempfindlichkeit der immunisierten Tiere zurückzuführen sein, die durch mancherlei Tatsachen bewiesen wird. Es ist klar, daß für diesen Fall die Danysz-Bordetsche Erklärung sich kaum wird heranziehen lassen; wie könnte denn ein gebundenes und zwar durch einen großen Antitoxinüberschuß gebundenes Toxin immunisierend wirken? — es sei denn, daß man den Verbindungen auch immunisierende Wirkungen zuschreiben würde, wodurch sie dann freilich bereits alle Eigenschaften eines Toxinüberschusses besäßen — mit Ausnahme der Benennung.

Nach Injektion von Toxin bei schon immunisierten Tieren wurde noch eine interessante Beobachtung von einigen Forschern festgestellt, die erst im Lichte der bisher erörterten Anschauungen unserem Verständnis näher gerückt wird. Injiziert man einem solchen Tiere, dessen Serum einen bekannten Gehalt an Antitoxin aufweist, eine bestimmte Menge Toxin, so muß natürlicherweise unmittelbar nach der Injektion der antitoxische Wert des Serums sinken zum Ausdruck für die stattgehabte Bindung eines Teiles des Antitoxins durch das eingeführte Toxin. Berechnet man aber den eingetretenen Antitoxinverlust im Verhältnisse zum Toxin, so zeigt es sich, daß er unvergleichlich größer ist, als dem kalkulierten Neutralisationswerte entsprechen würde, was sich auch im steilen Abfalle der Antitoxinkurve kundgibt. Um ein Beispiel herauszugreifen, will ich hier folgende Beobachtung von Salomonsen und Madsen an einem gegen Diphtherietoxin immunisierten Pferde anführen; das 665 kg wiegende Pferd hatte vor der betreffenden Injektion einen Antitoxingehalt von 100 I.E. pro 1 ccm, also im ganzen Blute $25\,000 \times 100 \text{ I.E.} = 2\,500\,000 \text{ I.E.}$ Nach Injektion von 1 l Toxin = 38 461 DLM sank der Antitoxinwert auf 65 I.E., folglich betrug der Verlust $25\,000 \times 35 \text{ A.E.} = 875\,000 \text{ I.E.}$ (berechnet für $\frac{665}{13} = 50 \text{ l}$ Blut = 25 l Serum), während zur Neutralisation des injizierten Toxins 385 I.E. genügt hätten. Wir sehen also, daß das eingeführte Toxin mehr als 2000mal soviel Antitoxin gebunden hat, als es nach dem Neutralisationswerte in vitro hätte tun sollen, wobei man noch bedenken muß, daß ein Teil des Toxins an der Bindung unbeteiligt sein mußte, um von den empfänglichen Elementen verankert werden und neuerliche Antitoxinproduktion anregen zu können. Eine ganze Reihe analoger Tatsachen läßt sich auch aus den von Dzierzowski angeführten Tabellen herauslesen, welche die Geschichte seiner gegen Diphtherie immunisierten Pferde betreffen. Ueber ähnliche Befunde bei der Immunisierung von Ziegen gegen Botulismustoxin berichten Forssmann und Lundström: die 36 kg schwere Ziege hatte einen solchen Antitoxingehalt des Serums, daß 1 ccm davon 100 000 DL neutralisierte,

folglich ihr ganzer Serumgehalt von ca. 1400 ccm 1400000 DL. Nach einer neuerlichen Giftinjektion von 100000 DL sinkt der Antitoxingehalt auf 600 DL = L_0 . d. i. der Antitoxinverlust beträgt 1400 . 400 DL = 560000 DL, während nur 100000 zur Neutralisation nötig waren. Aus diesen Befunden folgt unabweisbar, daß auch im Tierkörper das Toxin in Gegenwart eines Antitoxinüberschusses ein hohes Multiplum derjenigen Antitoxinmenge zu binden vermag, die sich beim Neutralisationsversuche zu seiner Entgiftung nötig erweist. Daß übrigens dieses Verhalten ein allgemeines sein dürfte, beweist folgender von Bulloch bei einem mit Ochsenblut immunisierten Kaninchen erhobene Befund. Das ca. 5 kg schwere Tier hatte vor der Injektion einen derartigen Immunkörpergehalt, daß 0,04 ccm Serum die komplett lösende Dosis für 1 ccm 5-proz. Ochsenblutes darstellte, folglich genügte sein ganzes Serum (ca. 180 ccm), um 25×180 ccm 5-proz. Ochsenblut = 225 unverdünntes Ochsenblut komplett aufzulösen. Nach einer Injektion von 13 ccm Ochsenblut hätte nun das ganze Serum $225 - 13 = 212$ ccm Ochsenblut lösen sollen, folglich für 1 ccm 5-proz. Ochsenblut $\frac{180}{212 \times 20}$ ccm = 0,0425 ccm. In Wirklichkeit war der Verlust so groß, daß erst 0,3 ccm zur kompletten Lösung von 1 ccm 5-proz. Ochsenblutes genügte, also die ganze Serummenge zur Lösung von 600 ccm 5-proz. Blutes = 30 ccm unverdünnten Blutes. Der Verlust entsprach also der Neutralisierungskraft von $225 - 30$ ccm = 195 ccm Blut, während in Wirklichkeit nur 13 ccm, also der 15. Teil dieser Menge, injiziert wurde. Es ist also klar, daß das eingeführte Blut sich mit Immunkörpern übersättigt hat, ähnlich wie es dies in den Ehrlichschen Versuchen in vitro tat.

Endlich möchte ich nicht verfehlen, auf eine praktische Konsequenz der hier vertretenen Anschauung aufmerksam zu machen, die speziell auf die Serotherapie des Tetanus Bezug hat. Nimmt man an, wie es wohl berechtigt erscheint, daß der bei der Toxin-Antitoxinbindung resultierende Toxinüberschuß um so geringer ausfällt, je größer die reagierende Antitoxinmenge ist, so wird man in Fällen von menschlichem Tetanus den Rat Behrings, energische und große Serumdosen von vornherein zu verwenden, aufs wärmste befürworten müssen. Das an der Infektionsstelle sezernierte Gift gelangt successive in kleinen Mengen ins Blut und wird hier relativ große Antitoxinmengen binden können. Es besteht nun einerseits die Gefahr, daß dann der Antitoxingehalt erschöpft wird und dann die Intoxikation zuletzt noch die Oberhand gewinnt, oder aber daß geringe Giftüberschüsse gebunden werden und zwar möglicherweise von durch vorherige Giftwirkung überempfindlichen Elementen. Jedenfalls wird es also geraten sein, gleich von vornherein große Antitoxindosen anzuwenden und nicht früher mit der Antitoxinzufuhr aufzuhören, als die Tetanussymptome verschwunden sind. Daß die ausgesprochenen Möglichkeiten recht nahe liegen, zeigen übrigens Versuche von Roux und Vaillard, in denen Meerschweinchen nach einer Infektion mit Tetanussporen große Dosen von Antitoxin bekamen und bei denen längere Zeit hindurch die Krankheit unterdrückt zu sein schien, um dann plötzlich aufzuflackern und binnen kurzer Zeit letal zu werden. Das Blut dieser Tiere enthielt aber nichtsdestoweniger freies nachweisbares Antitoxin selbst im Momente des Exitus. — Indem ich diese Zeilen schreibe, möchte ich bemerken, daß ich mir dessen wohl bewußt bin, daß die hier vertretene Theorie noch manche Mängel be-

sitzt, daß sie noch manche Frage offen läßt und daß damit auf diesem Gebiete noch lange nicht das letzte Wort gesprochen ist. Ich glaubte mit ihr eine Reihe von Tatsachen am besten erklären zu können und stelle sie hiermit zu öffentlicher Diskussion sowie experimenteller Prüfung, die über ihr Schicksal entscheiden mögen.

Krakau, den 15. April 1903.

Nachtrag.

Während der Drucklegung dieser Arbeit ist in der Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 18 die interessante Arbeit von Landsteiner und Jagie „Ueber die Verbindungen und die Entstehung von Immunkörpern“ erschienen. Wenn ich auch die Ansichten der Autoren über die Existenz einer Mehrzahl verschieden zusammengesetzter Agglutininverbindungen von verschiedenen Eigenschaften nicht teilen kann und mir noch vorbehalte, darauf in Zukunft zurückzukommen, will ich hier die in Uebereinstimmung mit dem oben Ausgeführten acceptierte Reversibilität der Agglutinationsreaktion hervorheben.

Literatur.

- v. Behring, E., Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten. Heft 1. Wien und Leipzig 1898.
- v. Behring, E. u. Kitashima, Ueber Verminderung und Steigerung der ererbten Giftempfindlichkeit. (Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 6. p. 157.)
- Bordet, J., Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XIV. 1900. No. 5. p. 257—297.)
- , Sur le mode d'action des antitoxines sur les toxines. (Ibid. T. XVII. 1903. No. 3. p. 161—187.)
- Bongiovannini, Al., Azione emolitica ed agglutinante comparativa in vivo ed in vitro. (Riforma med. 1901. Vol. II. No. 28—30 [103—105].)
- Buchner, H., Ueber Bakteriengifte und Gegengifte. (Münch. med. Wochenschr. 1893. p. 480.)
- Bulloch, W., Ueber die Beziehung zwischen Hämolyse und Bakteriolyse. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIX. No. 18. p. 731—732.)
- Cobbett, L., Enthält das normale Pferdeserum Diphtherieantitoxin? (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVI. No. 18/19. p. 548—554.)
- Danysz, J., Contribution à l'étude des propriétés et de la nature des mélanges des toxines avec leurs antitoxines. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XVI. 1902. No. 5. p. 331—345.)
- v. Dungern, E., Beiträge zur Immunitätslehre. (Münch. med. Wochenschr. 1900. No. 20 u. 28.)
- Dreyer, G. und Madsen, Th., Ueber Immunisierung mit den Toxinen des Diphtheriegiftes. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXVII. p. 250—268.)
- Dzierzgowski, S., De l'antitoxine contenue dans le sang et les organes des chevaux immunisés contre la diphtérie. (Arch. des sc. biol. T. V. No. 2/3. St. Pétersb. 1897. p. 123—154.)
- , Przyczynek do sprawy nodporniania zwierząt przeciw btonicy i do sprawy wyrobu surowicy przeciwbtonicznej. (Gaz. lekarska. 1902. No. 14—16. p. 352—363, 386—390, 405—413.)
- , De l'immunisation des animaux contre la diphtérie et de la préparation du sérum antidiphthérique. (Arch. des sc. biol. T. IX. St. Pétersb. 1902. No. 3. p. 293—321.)
- , Przyczynek do kwestyi powstawania antytoksyny btonicznej w zwyktych warunkach życia zwierząt i przy sztucznem nodpornianiu ich. (Gaz. lekarska. 1903. No. 14, 15. p. 317—322, 344—349.)
- Ehrlich, E., Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Ueber Ricin. II. Ueber Abrin. (Dtsche med. Wochenschr. 1891.)
- , Zur Kenntnis der Antitoxinwirkung. (Fortschr. d. Med. Bd. XV. 1897. No. 2. p. 41.)
- Ehrlich, E. und Morgenroth, Ueber Hämolsine. V. u. VI. Mitteilung. (Berl. klin. Wochenschr. 1901. p. 251, 569.)

- Eisenberg, Ph. und Volk, Untersuchungen über die Agglutination. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XL. p. 155—195.)
- Eisenberg, Ph., Beiträge zur Kenntnis der spezifischen Präzipitationsvorgänge. (Bull. de l'acad. des sc. de Cracovie. Classe des sc. math. et nat. Mai 1902. p. 289—310.)
- Forsmann, J. und Lundström, E., Sur la marche de la courbe d'antitoxine dans l'immunisation active contre le botulisme. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XVI. 1902. No. 4. p. 294—305.)
- Heidenhain, M., Ueber chemische Umsetzungen zwischen Eiweißkörpern und Anilin-farben. (Pflüg. Arch. Bd. XC. Heft 3/4. p. 115—230.)
- Joos, A., Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination. II. Teil. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XL. p. 203—230.)
- Kossel, Zur Kenntnis der Antitoxinwirkung. (Berl. klin. Wochenschr. 1898. No. 7. p. 152.)
- Kraus, R. und v. Pirquet, Cl., Weitere Untersuchungen über spezifische Niederschläge. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXII. No. 1. p. 60—74.)
- Kraus, R. und Sternberg, C., Ueber Wirkungen der Hämolyse im Organismus. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXII. No. 12. p. 904.)
- Kretz, R., Ueber die Beziehungen von Toxin und Antitoxin. (Zeitschr. f. Heilk. 1901. Heft 4.)
- , Ueber die paradoxe Reaktion. (Verh. d. deutsch. path. Ges. Karlsbad 1902. 22. Sept.; Ref. Centralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. Bd. XIII. 1902. No. 18. p. 723—724.)
- Lau, C., Ueber vegetabilische Blutagglutinine. [Inaug.-Diss.] Rostock 1901. (Ref. Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Ref. Bd. XXXII. No. 13. p. 402—403.)
- Linossier, G. et Lemoine, G. H., Sur quelques conditions d'action des sérums précipitants. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1903. No. 10. p. 320.)
- London, S., Contribution à l'étude des spermolysines. I. Comm. (Arch. russ. d. sc. biol. T. IX. No. 1. p. 82—127.) [éd. russe.]
- Marengi, G., Nuove osservazione sull' azione reciproca della tossina e dell' antitossina difterica. (Rend. del R. Ist. Lomb. di scienze e lettere. S. II. Vol. XXXIV. p. 1193—1207.)
- Meade-Bolton, Journ. of exper. Med. Vol. I. p. 543.)
- Michaelis, L. und Oppenheimer, C., Ueber Immunität gegen Eiweißkörper. (Sep.-Abdr. aus Arch. f. Anat. u. Phys. Phys. Abt. 1902. Suppl. p. 364.)
- Morgenroth, J., Ueber die Bindung hämolytischer Ambozeptoren. (Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 2. p. 61—62.)
- Neisser, M. und Lubowski, R., Läßt sich durch Einspritzung von agglutinierenden Typhusbacillen eine Agglutininproduktion hervorrufen? (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. No. 13.)
- Neisser, M. und Shiga, K., Ueber freie Rezeptoren von Typhus- und Dysenteriebacillen und über das Dysenterietoxin. (Dtsche med. Wochenschr. 1903. No. 4. p. 61—62.)
- Nicolle, Ch. et Trénel, La nature de la combinaison etc. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1900. p. 1088.)
- Nolf, P., Contribution à l'étude des sérums antihématiques. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XIV. 1900. No. 5. p. 297—330.)
- Paltauf, R., Fortsetzung der Diskussion zum Vortrage Grubers. (Wien. Ges. d. Aerzte. 1901. 29. Nov.; Wien. klin. Wochenschr. 1901. No. 49. p. 1217—1218.)
- Pfeiffer, R., Ueber die immunisierende Wirkung mit Choleraambozeptoren beladener Choleraavibrionen. (Dtsche med. Wochenschr. 1901. No. 50, 51.)
- Pfeiffer, R. und Friedberger, E., Ueber das Wesen der Bakterienvirulenz nach Untersuchungen an Choleraavibrionen. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 25. p. 583.)
- Ransom, F., Saponin und sein Gegengift. (Dtsche med. Wochenschr. 1901. No. 13. p. 194—196.)
- Réhn, J., Contribution à l'étude de l'immunité acquise. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1900. p. 1058.)
- Roux, E. et Martin, L., Contribution à l'étude de la diphtérie (sérum-thérapie). (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. VIII. 1894. No. 9. p. 609—639.)
- Roux, E. et Vaillard, L., Contribution à l'étude du tétanos. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. VII. 1893. No. 2. p. 65—140.)
- Rostoski, Zur Kenntnis der Präzipitine. (Verh. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg. N. F. Bd. XXXV. 1902. Sep.-Abdr.)
- Sachs, H., Immunisierungsversuche mit immunkörperbeladenen Erythrocyten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXX. No. 13.)
- Salomonsen, J. et Madsen, Th., Recherches sur la marche de l'immunisation

active contre la diphtérie. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XI. 1897. No. 4. p. 315—333.)

Salimbeni, A. T., Recherches sur l'immunité dans le choléra I. Sur l'agglutination. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XI. 1897. No. 3. p. 277—286.)

Schur, H., Ueber die Wirkungsweise des Staphylolysin. (Hofm. Beitr. z. chem. Phys. u. Path. Bd. III. 1902. Heft 1/3.)

Sélinow, A. G., De l'action du sérum antidiphthérique sur la toxine diphtérique. (Arch. russ. des sc. biolog. T. VII. 1899. p. 364—373.) [éd. russe.]

Stephens, Ch. and Myers, W., The influence of cobra poison on the clotting of blood and the action of Calmette's "antivenomous serum" upon the phenomenon. (Journ. of Anat. Vol. XXIII. 1898. p. 1.)

Wladimiroff, Ueber die immunisierende und antitoxinerzeugende Wirkung des Tetanusgiftes bei Tieren. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XV. 1893. p. 405—423.)

Nachdruck verboten.

On the heat lability of the complements of cold-blooded animals¹).

[From the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Mass.]

By **Hideyo Noguchi**, M. D., Assistant in pathology,
University of Pennsylvania.

The study of serum complements of warm blooded animals has led to conflicting views upon their nature. According to some — Buchner (1), Wilde (2), Bordet (3), Gruber (4) — they are uninitotic bodies which, as alexines, act upon susceptible cells — bacteria, body-cells — and bring about their dissolution. According to this view a given serum contains a single complement or alexine which is brought into combination with the foreign cells through the operation of certain intermediate substances — substance sensibilisatrice, amboceptor — which differs for different kinds of cells. According to another view, that held by Ehrlich (5), his co-workers, and supporters, the complements are pluralistic bodies which differ in their combining capacities whereby their action is restricted within definite limits, as determined by this combining affinity with particular amboceptors. A given serum may contain several or even many complements and these in turn may exhibit, besides the distinction of combining power with amboceptors, other differences as in respect to their resistance to the injurious action of heat, acids, alkalies, and digestive ferments; and also as regards their ability to pass through unglazed porcelain filters.

In the course of experiments upon the haemolysins of cold-blooded animals (6) carried out last summer a few experiments were conducted to test the variations in heat lability of the serum complements of a small number of the species used for the experiments. The results are of interest in themselves and bear upon the broader question of the multiplicity of serum complements wherefore they are presented at this time.

For the purpose of the experiments to be given, the sera of four species of animals were employed. These were: *Mustelus canis* (dog

1) This study was conducted under a grant from the Carnegie Institution of Washington, D. C.

fish), *Cynoscion regalis* (squeteague), *Amphiuma means* (Congo eel) and *Rana catesbiana* (bull frog).

The fresh serum of *Mustelus canis* showed the following haemolytic powers when used in the proportion of 1 ccm of fresh serum and 5 % of defibrinated blood:

Blood of <i>Rana catesbiana</i>	Haemolysis: 15 minutes
" " <i>Amphiuma means</i>	" 40 "
" " <i>Cynoscion regalis</i>	" 5 "
" " <i>Chrysemys picta</i> (painted turtle)	" 45 "
" " <i>Emys meleagris</i> (box tortoise)	" 10 "

The fresh serum of *Cynoscion regalis* used in the same manner gave the following result:

Blood of <i>Rana catesbiana</i>	Haemolysis: 10 minutes
" " <i>Amphiuma means</i>	" 40 "
" " <i>Chrysemys picta</i>	" 30 "
" " <i>Emys meleagris</i>	" 20 "

The fresh serum of *Amphiuma means* gave the following result:

Blood of <i>Rana catesbiana</i>	Haemolysis: 15 minutes
" " <i>Chrysemys picta</i>	" 25 "
" " <i>Emys meleagris</i>	" 45 "

The fresh serum of *Rana catesbiana* gave the following result:

Blood of <i>Cynoscion regalis</i>	Haemolysis: 5 minutes
" " <i>Mustelus canis</i>	" 1 "
" " <i>Tautoga onitis</i> (Tautog)	" 2 "
" " <i>Brevoortia tyrannus</i> (Menhaden)	" 12 "

For the purpose of our experiments the blood sera were heated to temperatures of 40°, 45° and 50° C for 30 minutes, after which the haemolytic action was again tested.

Experiment I.

Serum of *Mustelus canis* heated for 30 minutes.

5 % blood of	40° C	45° C	50° C	Unheated serum
	Haemolysis			
<i>Rana catesbiana</i>	35 min.	none		15 min.
<i>Amphiuma means</i>	42 "	none		40 "
<i>Cynoscion regalis</i>	25 "	none		5 "
<i>Chrysemys picta</i>	52 "	partial 1 hr	none	45 "
<i>Emys meleagris</i>	partial 1 hr	none		10 "

Experiment II.

Serum of *Synoscion regalis* heated for 30 minutes.

5 % blood of	40° C	45° C	50° C	Unheated serum
	Haemolysis			
<i>Rana catesbiana</i>	35 min.	none		10 min.
<i>Amphiuma means</i>	Imperfect 60 min.	none		40 "
<i>Chrysemys picta</i>	40 min.	trace	none	30 "
<i>Emys meleagris</i>	none			20 "

Experiment III.

Serum of *Amphiuma means* heated for 30 minutes.

5 % blood of	40° C	45° C	50° C	Unheated serum
	Haemolysis			
<i>Rana catesbiana</i>	none			15 min.
<i>Chrysemys picta</i>	partial 1 hr	trace 1 hr	none	25 "
<i>Emys meleagris</i>	partial 1 hr	none		45 "

Experiment IV.

Serum of *Rana catesbiana* heated for 30 minutes.

5 °, blood of	40° C	Haemolysis		
		45° C	50° C	Unheated serum
<i>Cynoscion regalis</i>	25 min.	none		5 min.
<i>Mustelus cania</i>	30 „	trace	none	1 „
<i>Tautoga onitis</i>	trace	none		2 „
<i>Brevoortia tyrannus</i>	20 min.	30 min.	none	12 „

Conclusions.

1) The serum-complements of cold-blooded animals are highly labile bodies and are destroyed at temperatures below 50° C.

2) The serum-complements of these animals would appear to be multiple in that their action upon different species of red corpuscles is not only different, but the destruction of the complement for one kind of red corpuscle may be effected without loss of the entire complement-content of the serum.

3) The complements for given kinds of red corpuscles can be greatly reduced by heating the serum, without being entirely destroyed. When such reduction is brought about a slightly higher temperature completely abolishes the action of the complements.

4) The complements occurring in different sera show, for a given species of red corpuscle, different degrees of heat lability.

I wish to express my indebtedness to Professor Flexner for his kindness in suggesting this study to me.

References.

- 1) Buchner, Hans, Sind die Alexine einfache oder komplexe Körper? (Berl. klin. Wochenschr. Bd. XXXVIII. 1901. p. 835.)
- 2) Wilde, M., Ueber die Absorption der Alexine durch abgetötete Bakterien. (Ibid. p. 878) Idem, Ueber die Beeinflussung der Alexinwirkung durch Absorption. (Arch. f. Hyg. Bd. XLIV. 1902. p. 1.)
- 3) Bordet, J., Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. (Annal. de l'Institut Pasteur. T. XIV. 1900. p. 257.) Idem, Sur le mode d'action des sérums cytolytiques et sur l'unité de alexine dans un même sérum. (Ibid. T. XV. 1901. p. 303.)
- 4) Gruber, Max, Ueber Bakteriolyse und Hämolyse. (Münch. med. Wochenschr. Bd. XIV. 1901. p. 1925, 1965.)
- 5) Ehrlich u. Morgenroth, Ueber Hämolyse. (Berl. klin. Wochenschr. Bd. XXXVII. 1900. p. 681.) Ehrlich u. Sachs, Ueber die Vielheit der Komplemente des Serums. (Ibid. Bd. XXXIX. 1902. p. 298, 335.) Idem, Ueber den Mechanismus der Amboceptorwirkung. (Ibid. p. 492.) Sachs, Gibt es einheitliche Alexinwirkungen? (Ibid. p. 182, 216.) Ehrlich and Marshall, Ueber die komplementophile Gruppe der Amboceptoren. (Ibid. p. 585.) Morgenroth u. Sachs, Ueber die Komplementierbarkeit der Amboceptoren. (Ibid. p. 637.) Idem, Ueber die quantitativen Beziehungen von Amboceptor, Komplement und Antikomplement. (Ibid. p. 817.) Wendelstadt, Ueber die Vielheit der Amboceptoren und Komplemente bei Hämolyse. (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. p. 469.) Lipstein, Die Komplementablängung bei bakteriziden Reagenzglasversuchen und ihre Ursache. (Ibid. p. 560.) Marshall u. Morgenroth, Ueber Differenzierung von Komplementen durch ein Partialantikomplement. (Ibid. p. 570.) Wechsberg, Ueber die Wirkung bakterizider Immunsera. (Wien. klin. Wochenschr. Bd. XV. 1902. p. 337, 720.) Longcope, Study of the bacteriolytic serum-complements in disease, etc. (Univ. of Penna. med. Bulletin. Vol. XV. 1902. p. 331.)
- 6) Noguchi, Univ. Penna. med. Bulletin. Vol. XV. 1902. p. 295, 301.

Nachdruck verboten.

On the multiplicity of the serum haemagglutinins of cold-blooded animals¹⁾.

[From the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Mass.]

By **Hideyo Noguchi**, M. D., Assistant in pathology, Univ. of Pennsylvania.

In the course of my studies of the action of the blood sera of cold-blooded animals upon the erythrocytes of those animals²⁾ I took account of the coincident occurrence of agglutination. At the conclusion of the experiments upon those subjects Professor Flexner suggested that I study the heat lability of the agglutinins for erythrocytes of cold-blooded animals, and, also their behavior towards absorption tests. This I did in a few instances, the results of which I have thought of sufficient interest to warrant publication in a brief form.

The experiments upon heat lability were conducted with the serum of *Limulus polyphemus* — the horse-shoe crab. The clear serum, obtained from the body cavity, is highly agglutinative for the corpuscles of many cold-blooded animals. The species used and the results attained are given in Table I.

Table I.

Agglutinating power of normal *Limulus* serum.

Species of blood	<i>Mustelus canis</i>	<i>Emys meleagris</i>	<i>Brevoortia tyrannus</i>	<i>Paralichthys dentatus</i>	<i>Tautoga onitis</i>	<i>Cynoscion regalis</i>
Degree of agglutination	Strong 5 minutes	Strong 5 minutes	Strong 8 minutes	Mod. strong 10 minutes	Strong 5 minutes	Moderate 15 minutes

The serum of *Limulus* was now heated for 30 minutes to temperatures varying from 45° to 65° C, after which the agglutination was again noted. The results are given in Table II.

Table II.

Serum of *Limulus* heated for 30 minutes.

Species of blood	40° C	45° C	50° C	55° C	60° C	65° C
<i>Mustelus canis</i>	Mod. strong	Mod. strong	Moderate	Weak	None	
<i>Emys meleagris</i>	strong	moderate	weak	none		
<i>Brevoortia tyrannus</i>	moderate	weak	"	"		
<i>Paralichthys dentatus</i>	"	trace	none			
<i>Tautoga onitis</i>	strong	mod. strong	weak	trace	none	
<i>Cynoscion regalis</i>	moderate	moderate	"	very weak	trace	none

The absorption experiments were made with *Limulus* serum and were conducted by adding to the serum an excess of the washed corpuscles of the several species of animals. These were allowed to

1) This study was conducted under a grant from the Carnegie Institution of Washington, D. C.

2) Univ. of Penna. Med. Bulletin. Vol. XV. 1902. p. 295, 301.

remain in contact for one hour after which the separation of corpuscles and serum was made by centrifugalization. The serum was now treated with another species of corpuscles in the same manner. The results are given in Table III in which 20 ccm of the serum of *Limulus* has been employed.

Table III.

First fraction: serum of *Limulus* treated with corpuscles of *Mustelus canis*

Supernatant plus blood of	<i>Mustelus</i>	<i>Emys</i>	<i>Brevoortia</i>	<i>Paralichthys</i>	<i>Tautoga</i>
Agglutination	none	strong 5 min.	strong 10 min.	strong 15 min.	strong 5 min.

Second fraction: Serum of *Limulus* treated with *Mustelus* and *Brevoortia* corpuscles

Supernatant plus blood of	<i>Brevoortia</i>	<i>Emys</i>	<i>Paralichthys</i>	<i>Tautoga</i>
Agglutination	none	strong 8 min.	strong 15 min.	strong 8 min.

Third fraction: Serum of *Limulus* treated with *Mustelus*, *Brevoortia*, and *Emys* corpuscles

Supernatant plus blood of	<i>Emys</i>	<i>Paralichthys</i>	<i>Tautoga</i>
Agglutination	none	strong 20 min.	strong 10 min.

Fourth fraction: Serum of *Limulus* treated with *Mustelus*, *Brevoortia*, *Emys*, and *Paralichthys* corpuscles

Supernatant plus blood of	<i>Paralichthys</i>	<i>Tautoga</i>
Agglutination	none	strong 15 min.

Fifth fraction: Serum of *Limulus* treated with *Mustelus*, *Brevoortia*, *Emys*, *Paralichthys*, and *Tautoga* corpuscles

Supernatant plus blood of	<i>Tautoga</i>
Agglutination	none

The serum of *Limulus* is well adapted to experiments upon agglutination as it is almost without haemolytic power. Similar experiments conducted with the serum of *Mustelus canis* are of interest, perhaps, but are not free from the serious drawback that comes from the necessity of first heating the serum to destroy its haemolytic complement. However, after heating to 50° C the serum shows agglutinating power over the corpuscles of *Amphiuma means*, *Chelydra serpentina*, and *Pleuronectes Americanus*. The abstraction of the agglutinin for one species leaves those for the others in practically undiminished quantities.

On the basis of the experiments given the following conclusions seem warranted:

- 1) The serum of *Limulus polyphemus* contains several and perhaps many agglutinins which are, in part at least, specific to certain erythrocytes.
- 2) The agglutinins show varying degrees of heat lability, although temperatures of 40° C, when continued for 30 minutes, diminish the activity of all the agglutinins. Temperatures approaching 65° C seem to destroy wholly the agglutinating power of the serum for erythrocytes.
- 3) The complete absorption of agglutinins for one or several species of corpuscles from *Limulus* serum leaves the remainder of the aggluti-

nins in almost undiminished quantities. A slight difference has, in the case of certain erythrocytes, been noted in the rapidity with which the reaction is completed in the serum from which a part of the agglutinins has been removed.

4) The serum of *Mustelus canis*, in so far as its agglutinins are concerned, agrees in its action probably with that of *Limulus*.

5) *Limulus* and *Mustelus* sera contain a multiplicity of agglutinins for erythrocytes of cold-blooded animals.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einreichung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabsüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Inhalt.

- | | |
|---|---|
| <p>Bertarelli, E., Untersuchungen und Beobachtungen über die Biologie und Pathogenität des <i>Bacillus prodigiosus</i>, p. 193.</p> <p>Bonhoff, H., Studien über den Vaccinerreger. I., p. 242.</p> <p>Dean, George, A disease of the rat caused by an acid-fast bacillus, p. 222.</p> <p>Eisenberg, Philipp, Ueber die Bindungsverhältnisse zwischen Toxin und Antitoxin, p. 259.</p> <p>v. Hansemann, Ueber säurefeste Bacillen bei <i>Python veticularis</i>, p. 212.</p> <p>Kampmann, Hirschbruch u. Lange, Massenerkrankung bei Enten mit eigenartigem Diphtheriebacillenbefund der Conjunctiva, p. 214.</p> | <p>Klein, E., Weitere Untersuchungen über die Kleinsche tierpathogene Hefe, p. 224.</p> <p>Löwit, M., Ueber Niederschlagsbildung bei der Agglutination. (Schluß.), p. 251.</p> <p>Noguchi, Hideo, On the heat lability of the complements of cold-blooded animals, p. 283.</p> <p>—, On the multiplicity of the serum haemagglutinins of cold-blooded animals, p. 286.</p> <p>Segin, Adalbert, Ueber die Einwirkung der Bakterien auf verschiedene Zuckerarten, p. 202.</p> <p>Silberstein, Moritz, Beobachtungen über die Entstehung von jungen Malaria Parasiten aus älteren. (Schluß.), p. 225.</p> <p>Zupnik, L., <i>Bacterium muris</i>, p. 213.</p> |
|---|---|

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Kenntnis der anaeroben Bakterien des Menschen.

[Aus dem pathologisch-anatomischen Institute in Wien
(Prof. Dr. A. Weichselbaum).]

II. Zur Aetiologie des Gasbrandes.

Von Dr. Anton Ghon und Dr. Milan Sachs.

(Erster Teil.)

Mit 3 Tafeln.

Josef Sch., Schuhmachermeister, 48 Jahre alt, aufgenommen am 19. Dez. 1901 an die II. chirurgische Abteilung des k. k. allgemeinen Krankenhauses (Prof. Dr. v. Moselet) gestorben am 20. Dez. d. J. 1 Uhr nach Mitternacht.

Anamnese: Patient hatte angeblich seit 8 Tagen Schmerzen in der Ileocökalgegend. Habituelle Obstipation. Geringe Druckschmerzhaftigkeit des Abdomens. Aerztliche Diagnose: Cholelithiasis. Therapie: Aether sulf., Ol. therebinth., Olivenöl, Karlsbaderwasser. Darauf mehrere grün gefärbte Stühle, in denen angeblich vom Arzt Gallensand konstatiert wurde.

4 Tage später neuerliche Schmerzen in der Ileocökalgegend ohne Fieber.

Am Tage der Spitalsaufnahme (19. Dez.) heftige Schmerzen in der rechten Wade bei vollkommener Beweglichkeit des Beines. Um 4 Uhr p. m. $\frac{1}{4}$ Spritze Morphium in die Wade. Keine Druckschmerzhaftigkeit in der rechten Unterbauchgegend. Wegen zunehmender Schmerzen im rechten Beine um 7 Uhr p. m. wieder $\frac{1}{4}$ Spritze Morphium und, da der Arzt gleichzeitig Schwellung der rechten Gesäßbacke bemerkte, Ueberführung in das Spital.

Status praesens: 19. Dez. $\frac{3}{8}$ Uhr p. m. Patient matt, verfallen. Rechte Glutäalgegend geschwollen, ein ungefähr handtellergroßer Bezirk derselben zeigt tympanitisch klingenden Schall und Gasknistern bei Druck. Luftpolstergefühl. Per rectum ein etwa faustgroßer, zirkumskripter Tumor auf dem rechten Darmbeinteller tastbar. Puls kräftig, 75.

$\frac{1}{10}$ Uhr p. m.: Die knisternde Stelle in der rechten Glutäalgegend auf ca. 3 Handtellergröße angewachsen, bläulich gefärbt. An der Innenseite des rechten Oberschenkels, etwas unterhalb der Plica falcif., eine etwa guldenstückgroße, weißlich gefärbte Stelle von derselben Beschaffenheit.

$\frac{1}{12}$ Uhr p. m.: Schwellung der ganzen Gesäßbacke vergrößert, tympanitischer Schall über den ganzen rechten Oberschenkel verbreitet und handbreit nach aufwärts über das Poupartsche Band reichend.

1 Uhr nach Mitternacht: Agonie, Exitus. Der tympanitische Schall reicht bis 2 Finger unter dem Nabel in die Linea alba und im Bogen bis gegen die Spina anterior superior.

Sektionsbefund (Dr. Ghon), 8 Stunden post mortem:

Große männliche Leiche von starkem Knochenbau, mäßig gut genährt. Haut grauweiß, ebenso die sichtbaren Schleimhäute. Pupillen mittelweit, beiderseits gleich. Hals mäßig lang und schmal.

Thorax lang, ziemlich breit, gut gewölbt. In den unteren Thoraxpartien und im Bereiche des ganzen Abdomen reichlichst leicht verschiebliche kleinere Gasblasen tastbar. Das Unterhautbinde- und Fettgewebe dieser Partien am Durchschnitt sehr reichlich von kleinen Gasblasen durchsetzt, die Muskulatur jedoch frei davon.

Aehnlich beschaffen das Unterhautbinde- und Fettgewebe im Bereiche der vorderen Seite des linken Oberschenkels, bis ungefähr zum unteren Drittel desselben. An der Schnittfläche auch hier die Muskulatur frei von Gasblasen. Im Bereiche des Unter-

schenkels und des Fußes dieser (linken) Extremität Haut und Unterhautbindegewebe ohne Veränderungen.

Dagegen an der ganzen rechten unteren Extremität bis hinab zu den Zehen reichlich größere und kleinere Gasblasen tastbar. Die Extremität bedeutend voluminöser als die linke. Haut im Bereiche der vorderen Seite dieser Extremität blaß. Auf der Schnittfläche der Vorderseite des Fußrückens, des Unterschenkels und der unteren Hälfte des Oberschenkels nur das Unterhautbinde- und Fettgewebe reichlich von Gasblasen durchsetzt, während in der oberen Hälfte des Oberschenkels auch die Muskelscheiden und Muskeln selbst, die etwas dunkler gefärbt erscheinen, größere und kleinere Gasblasen zeigen und von ihrer Schnittfläche in spärlicher Menge eine seröse, rötlich gefärbte Flüssigkeit abrinnt. Aus den durchschnittenen Gefäßen dieser Partie träufelt in mäßig reichlicher Menge dunkelrotes flüssiges Blut, untermischt mit kleineren und größeren Gasblasen.

Hodensack ballonartig aufgetrieben durch reichlich im Unterhautbindegewebe angesammeltes Gas. Nach dem Einschneiden fällt der Hodensack sofort stark zusammen.

Die Hinterseite der linken unteren Extremität zeigt keine Veränderungen: Haut blaß, Unterhautbindegewebe und Muskulatur ohne Gasblasen.

Haut der linken Glutäalgegend blaß, Unterhautbinde- und Fettgewebe derselben sowie die Muskulatur jedoch von reichlichen kleinsten Gasblasen durchsetzt. Die Muskeln selbst bleich, wie gekocht, trocken, von ihrer Schnittfläche kein Saft abstreifbar.

Im Bereiche der unteren Rückenpartie, der rechten Glutäal- und Lumbalgegend, der Hinterfläche des rechten Oberschenkels sowie des oberen Drittels des rechten Unterschenkels die Haut bläulichrot, die Epidermis stellenweise in kleinerer oder auch in größerer Ausdehnung teils fehlend, teils fetzenartig abgelöst, oder aber an einzelnen Partien, so in der Lendengegend, um den Anus und an der Innenseite des rechten Oberschenkels in Form kleinerer oder größerer, bis faustgroßer Bläschen und Blasen abgehoben, die mit serös-hämorrhagischer Flüssigkeit gefüllt sind. Von der Schnittfläche dieser Partien fließt reichlich eine blutig-seröse Flüssigkeit ab, untermengt mit kleineren Gasblasen. Das Unterhautbinde- und Fettgewebe ist rötlich, von zahlreichen Gasblasen durchsetzt, ebenso die Muskulatur, die wie gekocht aussieht, stellenweise dunkler, stellenweise lichter gefärbt ist und an anderen Stellen wieder, so namentlich im Bereiche des rechten Oberschenkels, wie hämorrhagisch infiltriert erscheint. Aus den durchschnittenen Gefäßen dieser Partien entleert sich dunkles, flüssiges, mit Gasblasen durchsetztes Blut, Muskelstücke von diesen Partien verbreiten einen scharfen säuerlichen Geruch und schwimmen auf der Oberfläche des Wassers.

Innerhalb der zwei unteren Dritteile der Hinterfläche des rechten Unterschenkels ist die Haut wieder blaß und nur mehr das Unterhautbinde- und Fettgewebe von Gasblasen durchsetzt, die Muskeln hingegen frei davon und ohne Veränderungen.

Weiche Schädeldecke wenig fettreich, in den hinteren Partien sehr blutreich. Schädeldach 17 : 15 cm, bis zu 9 mm dick, Innenfläche glatt.

Leptomeningen an der Konvexität ziemlich gut gespannt, entlang den Gefäßen weißlich, verdickt, wenig blutreich. Hirnrinde gleichmäßig breit, graurot. Marksubstanz stärker durchfeuchtet. Ventrikel nicht erweitert, Ependym zart. Stammganglien, Medulla und Pons ohne Veränderungen.

Schilddrüse nicht vergrößert, gekörnt, mäßig blutreich.

Schleimhaut des Pharynx livid, die des Larynx und der Trachea blaß, glänzend.

Linke Lunge in den hinteren Partien des Oberlappens fixiert, Pleura daselbst mit bindegewebigen Membranen bedeckt, verdickt, sonst zart und glatt. Lungenspitze schiefrig induriert und von kleinen graugelben Knötchen durchsetzt, die übrigen Partien des Oberlappens sowie der Unterlappen lufthaltig, stärker durchfeuchtet, auf ihrer Schnittfläche reichlich schaumige Flüssigkeit vorquellend.

Rechte Lunge an der Spitze und in den oberen Partien des Unterlappens fixiert, Pleura über diesen Teilen sowie über den vorderen Partien des Unterlappens verdickt und mit bindegewebigen Membranen bedeckt. Lungenspitze gleichfalls induriert und von kleinen graugelben Knötchen durchsetzt, die übrigen Teile der Lunge gleichmäßig lufthaltig, stärker durchfeuchtet und blutreicher.

Im Herzbeutel eine Spur serös-hämorrhagischer Flüssigkeit. Herz nicht vergrößert, mäßig reichlich mit Fett bedeckt, in den Ventrikeln geronnene Blutmassen und von Gasblasen durchsetztes dunkles, flüssiges Blut. Klappenapparat zart und schlußfähig. Herzmuskel braungelb.

In den abhängigen Partien der Bauchhöhle und im kleinen Becken dicker, rahmartiger Eiter.

Leber nicht vergrößert, Kapsel zart, Oberfläche glatt, Ränder des linken Lappens scharf, die des rechten abgerundet. Parenchym ziemlich derb, wenig blutreich, hellgelb, Zeichnung erhalten. Von der Schnittfläche fließt aus den größeren Gefäßen in mäßiger Menge dunkles Blut ab, von Gasbläschen durchsetzt. Parenchym selbst frei von Gasblasen.

Milz 16 : 9 : 3,5 cm. Kapsel etwas gerunzelt, Pulpa braunrot, kaum abstreifbar, Stroma deutlich sichtbar.

Nieren nicht vergrößert, Kapsel leicht abziehbar und zart, Oberfläche glatt, Rinde nicht verbreitert, blaß, ebenso die Marksubstanz. Schleimhaut des Beckens und der Kelche blaß und glänzend.

Unterer Teil des Ileum und Coecum mit dem Wurmfortsatz an die Bauchwand fixiert, in ihrer Umgebung Eiter und Kotmassen. Nach Lösung dieser Adhäsionen findet man sowohl das Coecum als auch das untere Ileum in unmittelbarer Nähe der Klappe perforiert. Die Perforationsöffnungen sind von mißfarbigen fetzigen Rändern umgeben. Wurmfortsatz seiner ganzen Länge nach nicht verdickt, sein Serosaüberzug glatt, seine Schleimhaut blaß und zart. Im Lumen geringe Mengen grauweißen Schleimes. Ileocökalklappe in ein unregelmäßig begrenztes Geschwür umgewandelt, welches die ganze Zirkumferenz einnimmt und dessen Grund und wallartig erhabene Ränder aus grauweißen oder schwärzlichgrauen, vielfach hämorrhagisch infiltrierten, oberflächlich zeretzten Gewebmassen bestehen. In den Grund dieses Geschwüres münden die früher erwähnten Perforationsöffnungen.

Im unteren Ileum und Coecum reichlich braungelbe mit Gasblasen durchsetzte Fäkalmassen.

Serosa des unteren Ileum und des Dickdarmes stärker gerötet und mit eiterigen Exsudatmassen bedeckt. Peritonealer Ueberzug der Bauchwand entsprechend den Parteen, an welchen Coecum und unterstes Ileum fixiert waren, mißfarbig und reichlich mit fester haftenden fibrinösen Exsudatmassen bedeckt. In der Umgebung das Peritoneum teilweise durch Gasblasen abgehoben, das subperitoneale Bindegewebe sowie der Ileopsoas der rechten Seite reichlichst von größeren und kleineren Gasblasen durchsetzt.

Im übrigen Peritoneum parietale und viscerele stark gerötet und teilweise mit eiterigem Exsudate bedeckt.

Schleimhaut der übrigen Teile des Darmes sowie des Magens blaß, sonst unverändert.

Vena cava inferior prall gefüllt mit dunklem flüssigen Blut, untermischt mit reichlichen Gasblasen.

In der Harnblase größere Mengen sedimentierten gelblichen Harnes, Schleimhaut blaß.

Prostata klein, derb.

Schleimhaut der Urethra livid und zart.

Schleimhaut des Rectum und des S Romanum blaß.

Pankreas und Nebennieren unverändert.

Anatomische Diagnose: Perityphlitis nach Perforation eines ulcerierten Carcinoms der Ileocökalklappe. Diffuse Peritonitis. Gasbrand. Fettleber. Chronische Tuberkulose beider Lungenspitzen mit Anwachsung derselben. Lungenödem.

Bakteriologischer Befund (Untersuchung unmittelbar nach der Sektion, ca. 10 Stunden post mortem):

I. Deckglaspräparate. 1) Muskelstück (a) von der Hinterfläche des rechten Oberschenkels (älter erkrankte Partie) steril entnommen (No. 11, Taf. I):

Sehr reichlich Gram-positive Bacillen verschiedener Länge, ungefähr von der Größe der Anthraxbacillen, doch etwas schmaler, mit abgerundeten Enden. Vielfach endogene Sporenbildung und zwar bei den kürzeren Formen meist mittelständig mit Auftreibung des Bacillenleibes, bei den längeren Formen jedoch vorwiegend polständig (= die Spore ist dem einen oder anderen Pole näher gerückt); vereinzelt an längeren Formen auch an beiden Polen Sporenbildung. Spärlich freie Sporen. Neben diesen Formen in geringer Anzahl längere oder kürzere Fäden, von derselben Dicke wie die beschriebenen Bacillen, ohne Sporen, teils gleichmäßig Gram-positiv, seltener gleichmäßig Gram-negativ oder auch solche Formen, die teils Gram-positiv, teils Gram-negativ erscheinen, i. e. neben violett gefärbten noch rot tingierte (Fuchsinnachfärbung) Stellen zeigten (= Uebergangsformen). Endlich kleinere und schmalere Gram-negative Bacillen, ebenfalls in geringerer Anzahl, teils gut, teils schwächer tingiert. An einzelnen dieser Formen findet man an den Polen noch Reste der Gram-Färbung (violette Punkte).

In mit Jod behandelten Präparaten erscheinen viele der Bacillen segmentiert braun gefärbt.

2) Muskel (b) von der linken Glutäalgegend (jünger erkrankte Partie) steril entnommen (No. 12, Taf. I):

Weniger reichlich Bakterien als bei 1. Meist Gram-positive Bacillen, im allgemeinen etwas plumper als die bei 1) beschrieben und ohne Sporen. Einzelne dieser Formen mehr weniger aufgetrieben. Spärlicher längere Formen, entweder gleichmäßig Gram-positiv oder — seltener — gleichmäßig Gram-negativ oder Uebergangsformen. Endlich spärlich dünne, kurze Gram-negative und dünne Uebergangsformen.

3) Herzblut: Ziemlich reichlich Gram-positive Bacillen, teils kurz und plump und dann oft aufgetrieben oder mit mittelständigen Sporen, teils länger mit und ohne polständigen Sporen, teils dünnere, kürzere Formen oder endlich spärlich längere, dickere oder dünnere Fäden. Vereinzelt schmale, verschieden lange Gram-negative Bacillen und Uebergangsformen.

4) Dickdarminhalt: Sehr reichlich Gram-positive Bacillen von verschiedener Form und Größe, darunter in mäßiger Anzahl große plumpe Bacillen und Uebergangsformen und spärlich kurze Formen mit mittelständigen Sporen von demselben Aussehen wie die bei 1) gefundenen. Reichlich Gram-positive Kokken verschiedener Größe und Gram-negative Bacillen verschiedener Größe und Form. Sehr lange, dünne Gram-negative Fäden in mäßig reichlicher Anzahl.

5) Dünndarminhalt: Dieselben Bakterienformen wie bei 4), nur weniger reichlich, zumal die Gram-positiven plumpen und die sporentragenden Formen.

6) Inhalt einer Blase der Rückenhaul. Mäßig reichlich Gram-positive Bacillen verschiedener Dicke, meist in kurzen Formen, spärlich Gram-negative Formen derselben Größe und ovale Sporen.

7) Exsudat der Bauchhöhle: Außerordentlich reichlich kleine Gram-negative Bacillen, spärlich lange, dünne Gram-negative Fäden. In mäßiger Menge Gram-positive Kokken als Diplokokken oder in kürzeren und längeren Ketten. Sehr spärlich teils dünnere, teils plumpere Gram-positive Bacillen.

II. Kulturen. A. Aërobe Kulturen (Agarplattenstrichkulturen).

- 1) Muskel a (steril entnommen): steril.
- 2) Muskel b (steril entnommen): steril.
- 3) Herzblut (nicht steril entnommen): unbrauchbar.
- 4) Dickdarminhalt: vorwiegend Kolonien eines Bacillus der Coli-Gruppe.
- 5) Inhalt einer Blase der Rückenhaul (nicht steril entnommen): 4 Kolonien eines Gram-negativen Bacillus, der Zucker vergor, Fleischbrühe diffus trübte und die Indolreaktion ergab.
- 6) Exsudat der Bauchhöhle: ziemlich reichlich Kolonien eines Bacillus der Coli-Gruppe, spärlicher Kolonien einer Streptokokkenart.

B. Anaërobe Kulturen.

α) Zuckeragarschüttelkulturen mit und ohne Ueberschichtung:

1) Muskel a (steril entnommen): In den nicht erhitzten Kulturen reichliches Wachstum mit Gasbildung.

Deckglaspräparate, nach 48-stündigem Wachstum, zeigen reichlich schlanke Fäden, vielfach gewunden und meist Gram-positiv, vereinzelt besonders zart und Gram-negativ, dann kurze und verschieden dicke Gram-positive Bacillen, manche in der Mitte oder an einem Ende aufgetrieben (pleomorphes Bild).

In den Kulturen, die durch 10 Minuten auf 75° C erhitzt waren, gleichfalls Wachstum mit Gasbildung. Deckglaspräparate davon zeigen dasselbe Bild wie die aus den nicht erhitzten Kulturen.

2) Muskel b (steril entnommen): In den nicht erhitzten Kulturen Wachstum in isolierten Kolonien ohne Gasbildung. Die Kolonien sind rundlich mit bräunlichem kleinen Kern und peripherem wolkenähnlichen Astwerk feiner Fäden.

Deckglaspräparate davon zeigen im allgemeinen dasselbe Bild wie bei 1), nur finden sich auch sporentragende Formen und freie Sporen in spärlicher Menge.

In den auf 75° C durch 10 Minuten erhitzten Kulturen erfolgte erst nach 6 Tagen Wachstum ohne Gasbildung.

3) Herzblut (nicht steril entnommen): In den nicht erhitzten Kulturen reichliches Wachstum mit Gasbildung. In Deckglaspräparaten davon zahlreiche plumpe, Gram-positive Bacillen, spärlicher Gram-negative kleine Bacillen und gegliederte Fäden kleiner Gram-positiver Bacillen.

In den auf 75° C durch 10 Minuten erhitzten Kulturen gleichfalls Wachstum mit Gasbildung. Deckglaspräparate davon zeigen Bacillen verschiedener Form und Größe bis zu langen, schlanken Fäden mit klostridienartigen Formen und von wechselndem Verhalten gegenüber der Methode von Gram. Sporenbildung.

4) Dünndarminhalt: In den nicht erhitzten und den auf 75° C durch 10 Minuten erhitzten Kulturen reichliches Wachstum mit Gasbildung. In ersteren ein Bakteriengemenge, in letzteren reichlich Gram-positive plumpe Bacillen, spärlicher Gram-positive schlankere Formen mit Auftreibungen und sporenlähnlichen Gebilden und dickere und dünnere Gram-negative Formen mit Anschwellungen und in Fäden sowie Uebergangsformen.

5) Dickdarminhalt: Die nicht erhitzten Kulturen wie bei 4.

Die erhitzten zeigen Wachstum mit Gasbildung und in Deckglaspräparaten davon fast ausschließlich große, plumpe Gram-positive Bacillen und nur sehr wenige kleine, schmale Gram-negative Formen.

6) Exsudat der Bauchhöhle: In den nicht erhitzten Kulturen Wachstum mit Gasbildung, ebenso in den 10 Minuten auf 75° C erhitzten. Deckglaspräparate der ersteren zeigen ein Bakteriengemenge, darunter in spärlicher Menge auch plumpe Gram-positive Bacillen, die der letzteren schlankere Gram-positive Bacillen verschiedener Größe und auch in Fäden, die vielfach gewunden sind, spärlicher plumpe Gram-positive Formen und klostridienähnliche Gebilde und ebenfalls spärlich Gram-negative dickere und dünnere Bacillen.

7) Inhalt einer Blase der Rückenhaut (nicht steril entnommen): In den nicht erhitzten Kulturen Wachstum mit Gasbildung und in den davon angelegten Deckglaspräparaten neben Gram-positiven etwas plumpen Bacillen gegliederte Fäden von kleineren und schmäleren Gram-positiven Bacillen und Gram-negative kurze Stäbchen.

8) Anaerobe Plattenstrichkulturen (Zuckeragar) in Wasserstoffatmosphäre (4 Tage bei 37° C) von:

1) Muskel b (steril entnommen): Gleichmäßiger, sehr zarter, grauer Ueberzug. Deckglaspräparate davon zeigten vorwiegend Gram-negative, ziemlich schlanke Bacillen verschiedener Länge von fast kokkenartigen Formen bis zu längeren Fäden. Die Bacillen sind teils gerade, teils mehr weniger gekrümmt und verschieden stark gefärbt, meist schwächer tingiert. Daneben größere und dickere Gram-negative Formen, und solche, die angeschwollen oder wie gebläht aussehen. Spärlicher Bacillenformen von demselben Aussehen, die teils violett, teils rot gefärbt sind und schließlich Formen, gleichfalls spärlicher, die gleichmäßig — und zwar stärker oder schwächer — Gram-positiv sind. Unter letzteren häufig angeschwollene Formen oder solche mit kugeligen Auftreibungen. Zwischen allen beschriebenen Formen Uebergänge. An manchen der Bacillenformen astförmige Auswüchse. Vereinzelt freie ovale Sporen.

2) 8-stündiger Zuckeragarschüttelkultur von Muskel b: Platte zeigt dasselbe Aussehen wie bei 1), ebenso die Deckglaspräparate davon, nur prävalieren unter den Gram-negativen Formen längere Fäden und unter den Gram-positiven die angeschwollenen, birn- oder keulenförmig aussehenden Gebilde. Außerdem sieht man in mäßig reichlicher Menge Gram-positive Formen mit mittelständigen oder polständigen Sporen.

3) 8-stündiger Zuckeragarschüttelkultur von Muskel a, 4. Generation (ursprüngliche Kultur durch 10 Minuten auf 75° C erhitzt): Platte wie bei 2), ebenso die Deckglaspräparate davon.

4) 8-stündiger Zuckeragarschüttelkultur vom Dünndarminhalt: Reichlich ziemlich große Kolonien mit bräunlichem Zentrum und grau glänzender Peripherie aus gleichmäßig plumpen Gram-positiven Bacillen bestehend und spärliche flache grauweiße Kolonien aus Gram-negativen kurzen Bacillen bestehend.

5) 8-stündiger Zuckeragarschüttelkultur vom Exsudat aus der Bauchhöhle. Diffuses Wachstum entlang den Impfstichen, aus Gram-positiven Kokken, kurzen, Gram-negativen und plumpen, großen Gram-positiven Bacillen bestehend.

Histologisch-bakteriologischer Befund (Fixierung in Müller-Formol mit Nachhärtung in Alkohol, Einbettung in Paraffin und Celloidin, Färbung mit Hämalaun-Eosin, Boraxmethylblau und polychromem Methylblau von Unna, nach den Methoden von van Gieson, Gram, Gram-Weigert und Ziehl-Neelsen, sowie mit Weigerts Farbstoff für elastische Faserfärbung):

1) Muskel: Zur Untersuchung gelangten Muskelstücke der rechten Glutäalgegend, der Innenfläche des rechten Oberschenkels sowie der unteren Rückenpartie, und zwar sowohl Stücke von hämorrhagisch infiltriert aussehenden Partien als auch solche, die makroskopisch blaß und trocken sich zeigten — im ganzen 8 verschiedene Stücke.

Die Veränderungen zeigen an allen untersuchten Schnitten einen mehr weniger einheitlichen Charakter. Nicht bloß die Muskelbündel, sondern auch die Muskelfasern sind auseinandergedrängt durch Hohlräume, die verschieden groß und verschieden gestaltet sind: bald rundlich oder mehr oval, bald wieder länglich oder ampullenartig,

bald ganz unregelmäßig geformt. Getrennt sind diese Hohlräume voneinander durch verschieden breite Muskel- oder Bindegewebsbrücken, die oft außerordentlich schmal sind, manchmal auch schon Lücken zeigen, so daß dann die einzelnen Hohlräume untereinander kommunizieren. Die Hohlräume sind durchwegs ohne eigene Wandungen, entweder ganz leer oder aber mehr weniger vollständig erfüllt von einer fast homogenen, häufiger jedoch feinkörnigen oder aber locker gefügten fädig-netzigen Masse. Nicht selten nimmt letztere nur die Peripherie der Hohlräume ein, teils in ihrer ganzen Zirkumferenz, teils nur sichelartig, oder lagert sich bei länglich geformten an den Polen dieser ab und begrenzt nach innen zu scharf einen verschieden großen rundlichen oder ovalen leeren Raum. In viele der Hohlräume, die an den breiteren Stellen des Bindegewebes der inneren Muskelscheiden sich befinden, ziehen vom Rande in das Innere Fortsätze des Bindegewebes, zarter oder dicker, gerade oder zackig, nicht selten auch aufgefásert.

Neben den eben beschriebenen Hohlräumen sieht man in den schon makroskopisch hämorrhagisch infiltriert aussehenden Muskelpartien verschieden große Blutungsherde zwischen den Muskelbündeln und Muskelfasern, wodurch diese bald stärker, bald weniger stark auseinandergedrängt werden. Die Blutungen setzen sich verschieden scharf von ihrer Umgebung ab und bestehen vorwiegend aus roten Blutkörperchen, welche in ihrer Form fast durchaus gut erhalten sind. An vielen Stellen erscheinen sie auch mit Eosin noch stark gefärbt, an anderen hingegen blaß und wie ausgelaut. Weiße Blutkörperchen, ein- und mehrkernige, finden sich im allgemeinen spärlich, ihre Kerne sind immer dunkler gefärbt, ihr Protoplasma nicht oder nur angedeutet sichtbar. Sowohl in der Peripherie als auch in den zentralen Partien dieser Häorrhagieen findet man frei zwischen den Blutkörperchen verschieden reichlich elastische Fasern und längliche stark tingierte Kerne oder Kernreste (Reste des Perimysium).

Das Gewebe des Perimysium internum ist mehr weniger aufgelockert und stellenweise von einer fein gekörnt aussehenden, mit Eosin rötlich gefärbten Masse durchsetzt. Die Kerne desselben fehlen an vielen Stellen vollständig, oft über weite Strecken hin. An anderen Stellen wieder sind Kerne in meist geringer Menge noch sichtbar, distinkt stehend oder aber zu kleineren Gruppen vereinigt, dann meist in der Nähe von kleineren oder größeren Gefäßen. Sie sind länglich oder rund, seltener gelappt und meist dunkel gefärbt (Hämalaun). Daneben finden sich aber auch blässere oder ganz undeutlich tingierte Kerne und verschieden große Kernreste (Karyolysis). Wo letztere sich häufen, findet man in geringerer oder größerer Ausdehnung das Bindegewebe feinkörnig oder mehr homogen und bläulich gefärbt. Die elastischen Fasern (spezifische Färbung) des Perimysium internum sind meist auch dort noch gut erhalten, wo Kerne schon vollständig und über weite Strecken hin fehlen. Die Gefäße der inneren Muskelscheiden sind mehr minder gut erhalten, im allgemeinen ziemlich gut gefüllt. Die roten Blutkörperchen erscheinen in vielen derselben noch gut geformt und gefärbt, in anderen wieder mehr undeutlich und wie ausgelaut, die weißen vielfach vermehrt und in einigen der Gefäße in gehäufter Randstellung. An solchen Stellen findet man zwischen den Blutkörperchen auch schon streifige oder fein gekörnte, mit Eosin hellrot gefärbte Massen (Oedem). Im Lumen der Gefäße sieht man nicht selten ovale oder rundliche scharf begrenzte Hohlräume verschiedener Größe, die ähnlich beschaffen sind wie die früher zwischen den Muskelbündeln und -fasern beschriebenen und die von einem verschieden breiten Mantel von Blutkörperchen umsäumt erscheinen. Die Adventitia der Gefäße ist dort, wo völliger Kernschwund des Bindegewebes vorhanden ist, selbst an größeren Arterien ebenfalls kernlos, ebenso meist schon die äußeren Schichten der Muscularis, die dann meist in stärker glänzende und dunkler braun aussehende Schollen zerfallen erscheint. Noch schwerere Veränderungen findet man in den als Venen erkennbaren Gefäßen und zwar auch an den größeren, die nicht selten schon in ihrer ganzen Wand kernlos sein können oder doch nur mehr vereinzelt Kerne nachweisen lassen. Die Muscularis ist dann gleichfalls wie schollig zerfallen und dunkler braunrot und viele dieser Schollen zeigen braungelbe, unregelmäßige, kleine Körnchen. An kleineren derart oder noch stärker veränderten Venen, die oft nur mehr Reste ihrer Wandung erkennen lassen, findet man entsprechend ihrem Lumen neben wenigen roten Blutkörperchen meist länglich geformte Haufen von Kernen und Kernresten, verschieden stark tingiert und gestaltet. Aber auch an solchen Gefäßen sind die elastischen Fasern in den spezifisch gefärbten Präparaten noch gut erhalten und tingiert, desgleichen auch in der kernlosen Adventitia der größeren Arterien, sowie an den kleinen und kleinsten Gefäßen. Ähnliche Veränderungen wie die an den äußeren Gefäßwandschichten beschriebenen sieht man auch am Perineurium der Nervenäste.

Die Muskelprimitivbündel selbst zeigen verschiedene Veränderungen. Meist korrespondiert die Schwere derselben mit der in den Muskelscheiden. Wo völliger Kernschwund der letzteren nachweisbar ist, sind auch die Primitivbündel auf mehr weniger weite Strecken hin kernlos, und dann meist auseinandergedrängt durch feinkörnige, mit

Eosin rötlich gefärbte Massen oder durch schollenähnliche Gebilde verschiedener Größe die meist stärker glänzen, dunkler erscheinen und mitunter noch undeutliche Querstreifung erkennen lassen, demnach zerfallenen Muskelfasern entsprechen. Die in ihren Umrisen noch erhaltenen Fasern sind verschieden dick, bald lichter, bald dunkler gefärbt, gequollen, oft wie von Vakuolen durchsetzt oder aber wie abgebrochen und zerfallen. Die dadurch entstandenen Teilstücke erscheinen selbst wieder entweder vorwiegend der Länge nach aufgefasert oder aber der Quere nach in mehr weniger unregelmäßige Scheiben zerlegt oder endlich durch Zerfall der Länge und Quere nach in kleinste Einzelstücke zerteilt. In diesen Zerfallsprodukten der Muskelfasern erkennt man von den letzterwähnten Einzelstücken bis zu den früher beschriebenen scholligen Muskelresten alle Uebergangsbilder. Die Querstreifung ist an den veränderten Muskelfasern entweder völlig verloren gegangen oder aber noch mehr minder deutlich sichtbar, dann aber auch noch an solchen Fasern, welche die beschriebenen schwersten Veränderungen aufweisen. Auch findet man manchmal in den Muskelfasern oder ihren Resten in spärlicher Menge braugelbe Pigmentkörnchen. Analoge Veränderungen, nur im allgemeinen weniger hochgradig, finden sich in den Muskelfasern auch dort, wo die Kerne derselben noch mehr weniger deutlich erhalten sind.

Schon in den mit Hämalaun-Eosin gefärbten Präparaten sind innerhalb der so veränderten Gewebepartien reichlich Bacillen sichtbar, allerdings etwas undeutlich, während sie in den spezifisch für Bakterien gefärbten Präparaten scharf und deutlich hervortreten. Die Bacillen sind in den Schnitten nicht gleichmäßig verteilt, im allgemeinen aber sehr reichlich vorhanden, an vielen Stellen geradezu in enormen Mengen. Sie zeigen durchweg einen einheitlichen Charakter und sind Gram-positiv, obgleich sich in den nach Gram oder Gram-Weigert gefärbten Präparaten Unterschiede in der Färbungsintensität wahrnehmen lassen, sowie auch in der Gleichmäßigkeit der Färbung, indem die Bacillen häufig wie vakuolisiert aussehen. Auch in den mit den verschiedenen Methylblaulösungen tingierten Schnitten erscheinen sie nicht immer gleichmäßig gefärbt. Die Stäbchen sind verschieden groß, vorherrschend sind kürzere Formen, ungefähr 3mal so lang als breit. Daneben finden sich aber auch längere Formen sowie Fäden. Letztere sind meist kürzer, seltener länger, doch finden sich auch spärlich auffallend lange Fäden. Meist sind diese ungliedert und nur selten trifft man gegliederte. Die Bacillen sind im allgemeinen etwas schmaler als Milzbrandbacillen und variieren in der Dicke weniger, obwohl auch darin Unterschiede vorkommen. In den Methylblaupräparaten findet man nicht selten das eine oder andere Polende der Stäbchen, mitunter auch beide Pole stärker gefärbt und dann meist etwas verdickt. Auch sieht man spärlich kurze Bacillenformen, die in der Mitte oder an einem Ende aufgetrieben und daselbst untingiert erscheinen. In Präparaten, die nach Ziehl-Neelson behandelt waren, zeigen ziemlich viele der Bacillen meist an einem Ende eine ovale, leuchtend rot gefärbte Spore, die sich scharf von dem blau tingierten Bacillenleib abhebt. Die Stäbchen liegen vorwiegend im interstitiellen Bindegewebe, in den Blutungsherden auch zwischen den Blutkörperchen und dort, wo der Muskelzerfall schon stark vorgeschritten ist, in den Muskelfasern selbst, zwischen den Zerfallsstücken der Faser. Ebenso finden sie sich in den veränderten Gefäßwandpartien, meist also in der Adventitia und den äußeren Schichten der Muscularis, mitunter aber auch in der ganzen Wand und im Inneren der Gefäße selbst, hier allerdings meist spärlich und etwas reichlicher nur in solchen, die Gasblasen zeigen. Meist in größeren Mengen sieht man sie auch am Rande der Gasblasen in den Muskelscheiden. Im allgemeinen ist der Bacillenreichtum um so größer, je stärker ausgeprägt die nachweisbaren Veränderungen sind.

Andere Bakterien lassen sich in den untersuchten Schnitten nicht auffinden.

2) Haut (Stücke aus der rechten Lendengegend mit verschieden großen Blasen, die serös-hämorrhagischen Inhalt zeigen): Die Epidermis ist in Form kleinerer oder größerer Blasen und Bläschen vom Corium abgehoben. In den Blasen und Bläschen findet sich eine homogene, mit Eosin hellrot gefärbte Masse. Die Hornschicht der abgehobenen Epidermis ist streckenweise gequollen, die Kerne des Rete Malpighii sind meist gut gefärbt, die Umrisse der einzelnen Zellen noch deutlich sichtbar. An einzelnen Stellen allerdings findet man in den untersten Schichten des abgehobenen Rete in kleinerer Ausdehnung Kernschwund oder man findet die Kerne blaß gefärbt und mehr weniger undeutlich. Die basalen Zellen des Rete erscheinen gleichmäßig braun pigmentiert und seine Zapfen ragen verschieden weit frei in das Blaseninnere vor.

Die Papillarschicht des Corium ist fast kernlos, wie gequollen und nur die etwas erweiterten Gefäße der Papillen zeigen ihre Kerne noch mehr minder deutlich gefärbt. Die roten Blutkörperchen in den Gefäßen sind zwar in ihren Konturen meist noch gut erhalten, aber vollständig blaß tingiert und wie ausgelaugt, und um die Gefäße findet man häufig in Zellen eingeschlossenes, braungelbes, feinkörniges Pigment. Auch in den tieferen Schichten des Corium zeigt das Bindegewebe nicht selten vollständigen Kern-

mangel, an anderen Stellen wieder sind die Kerne erhalten, doch undeutlich oder blaß gefärbt. Aehnliches Verhalten zeigen auch die Kerne der glatten Muskelfasern und nur die Zellkerne der Gefäße erscheinen besser erhalten. Die Bindegewebsfasern sind häufig wie aufgelockert oder wie schollig zerfallen, nicht selten auch durch kleinere oder größere, verschieden geformte Hohlräume auseinandergedrängt. Haarbälge und Talgdrüsen zeigen sich meist noch gut erhalten, ebenso die Schweißdrüsen.

Analoge Veränderungen zeigt das Unterhautfettgewebe, besonders die bindegewebigen Septa der Fettläppchen, deren Fasern meist auseinandergedrängt sind durch eine feinkörnig aussehende Masse oder durch reichlicher vorhandene größere und kleinere Hohlräume. Auch die Gefäße des Unterhautbinde- und Fettgewebes sind in ihren Wandungen zum Teil schon kernlos und zeigen nicht selten im Inneren meist größere Gasblasen, welche die Blutkörperchen ring- oder sichelförmig gegen die Wandung pressen oder zwischen diesen und sich eine verchiedene breite, feinkörnig oder aber homogen aussehende Zone erkennen lassen. In den kleineren der Blutgefäße findet man manchmal überhaupt keine oder nur spärliche Blutkörperchen, dafür aber eine homogen aussehende oder fein granuliert, mit Eosin sich blaßrot färbende Masse oder man sieht neben wenigen noch erhaltenen roten Blutkörperchen blaß gefärbte und schon zerfallene, die dann zu einer fein granulierten Masse zusammengeballt erscheinen.

Elastische Fasern lassen sich überall in der Haut, sowie im Unterhautbinde- und Fettgewebe, besonders auch in den Gefäßen in reichlicher Weise durch die spezifische Färbungsmethode von Weigert nachweisen und erscheinen selbst in den Coriumpapillen in ihren feinsten Verzweigungen scharf und deutlich gefärbt.

Bakterien finden sich in allen Schichten der Schnitte, im allgemeinen jedoch weniger reichlich als in den früher beschriebenen veränderten Muskeln. Die Hautblasen sind frei von Bakterien, wohl aber sieht man sie in den Randschichten der entblößten Coriumpapillen und zwar vorwiegend in den an den Randteilen des Blasengrundes gelegenen. Im Corium, sowie im Unterhautbinde- und Fettgewebe liegen sie mehr zerstreut und nur dort reichlicher angehäuft, wo das Gewebe lockerer gefügt erscheint. Gegen die tiefer liegende Muskelschicht zu wird ihre Anzahl eine größere, in den Gefäßen finden sie sich im allgemeinen nur in spärlicher Menge. Die nachweisbaren Bakterien sind grampositive Bacillen, die in ihrem Aussehen und Färbverhalten vollständig den früher bei den Muskelveränderungen beschriebenen gleichen. Andere Bakterien lassen sich auch hier nicht auffinden.

3) Leber: Neben ziemlich hochgradiger Fettinfiltration sieht man in geringerem Grade auch fettige Degeneration, sowie mäßig reichlich, braungelbes, körniges Pigment in der Glissonschen Kapsel und spärlicher in den Leberzellen. Die Kerne der Zellen, und zwar sowohl des Parenchyms als auch des interstitiellen Gewebes, sind gut erhalten und ziemlich gleichmäßig gut gefärbt. Gasblasen lassen sich im Gewebe nicht nachweisen, auch nicht in den kleineren Blutgefäßen, wohl aber finden sich in einzelnen Blutgefäßen in mäßig reichlicher Menge grampositive Bacillen, die den bei 1 und 2 beschriebenen kurzen Formen entsprechen.

4) Die Milz ist mäßig blutreich und ohne besondere Veränderungen und läßt Bakterien nicht nachweisen.

5) Ileocöcalklappe: Schnitte, die senkrecht auf die Klappe geführt sind und sowohl Ileum als Coecum treffen, zeigen die Schleimhaut der Klappe in eine mehr oder weniger kernlose Gewebsmasse umgewandelt, in welcher die Lieberkühnschen Drüsen, im Ileum außerdem auch noch die Zotten ihren Umrissen nach oft nur mehr undeutlich erkennbar sind. Weiter gegen das Ileum zu werden die Zotten deutlicher sichtbar, stellenweise treten auch gefärbte Kerne und Kernreste in denselben hervor, oft in gehäufte Menge, und viele der Zotten erscheinen von größeren und kleineren Blutungen durchsetzt, manche sind vollständig hämorrhagisch infiltriert. An der Klappenbasis der Ileumseite fehlen die Zotten vollständig, ebenso die normalen Drüsen, und die Mucosa sowie Submucosa sind in größerer Ausdehnung substituiert durch eine teils kernlose, teils von ein- und mehrkernigen Leukocyten und roten Blutkörperchen durchsetzte, teilweise detritusähnliche Gewebsmasse, in welcher verschieden reichlich rundliche oder längliche oder auch verzweigte, größere und kleinere, an Tubuli mehr oder weniger erinnernde Zellstränge eingelagert sind sowie Reste derselben, die alle aus hohem cylindrischen Epithel bestehen, welches ein- oder mehrschichtig ist; die Kerne der Epithelzellen sind meist länglich oval, in den Randpartien dieser Gewebsmasse blässer oder oft undeutlich gefärbt, in den zentralen und tieferen Partien jedoch intensiv tingiert. Die beschriebene Gewebsmasse, deren Oberfläche gegen das Ileum zu stellenweise fibrinöse Exsudatmassen aufgelagert zeigt, dringt nach unten zu auch in die obersten Schichten der Muscularis. Die Schläuche erscheinen hier besonders reichlich verzweigt, die Kerne der Zellen intensiv gefärbt. In der Randzone dieser Aftermasse sind Binde- und Muskelgewebe reichlich von meist mehrkernigen Leukocyten durchsetzt.

Gegen das Coecum zu hingegen werden an der Klappe die Umrisse der Drüsen

allmählich deutlicher, ebenso die Zellkonturen, die Kerne treten reichlicher und besser tingiert hervor, desgleichen die Becherzellen, die Schleimhaut nimmt allmählich ihr normales Aussehen an, bleibt aber eine Strecke weit von ein- und mehrkernigen Leukocyten infiltriert.

Follikel und Plaques in der Schleimhaut der Klappe sind dort, wo der Kernschwund kein vollständiger ist, noch mehr oder minder gut sichtbar und häufig von Blutungen durchsetzt. Ebenso ist die Submucosa und teilweise auch die Muscularis der Klappe, entsprechend den Veränderungen der Schleimhaut, streckenweise kernlos. Die Bindegewebsfasern und zum Teil auch die Muskelfasern erscheinen wie gequollen und auseinandergedrängt durch größere und kleinere hämorrhagische Herde, in welchen die roten Blutkörperchen in ihren Konturen zwar meist erhalten sind, aber blaß und wie ausgelugt erscheinen. Dort wo Blutungen fehlen, findet sich zwischen den Fasern des Binde- und Muskelgewebes eine feingranulierte Masse, welche übrigens ebenso wie die Blutungen auch in der Muscularis mucosae zu finden ist. Außerdem aber finden sich in der ganzen Submucosa und auch in der Muscularis reichlich verschiedene große Hohlräume, teils rundlich, teils oval oder länglich, teils auch vollkommen unregelmäßig, nicht selten untereinander kommunizierend und dann wie von fetzigen Rändern begrenzt, welche entweder leer sind oder mehr oder weniger ausgefüllt von einer homogenen oder granuliert aussehenden, mit Eosin hellrot sich färbenden Masse. Gleich aussehende, jedoch kleinere Hohlräume, trifft man auch in der Schleimhaut der Klappe selbst und zwar meist im Bereiche der Muscularis mucosae, um das lymphatische Gewebe oder in letzterem selbst, so daß einzelne Plaques durch diese Lücken und die meist gleichzeitig vorhandenen Blutungen fast vollkommen zerstört erscheinen. Die beschriebenen Hohlräume sind auch im Coecumanteile der Klappe dort noch zu finden, wo der Kernschwund schon gut gefärbten und geformten Kernen Platz macht, ebenso finden sie sich in der entzündlich infiltrierten Peripherie des oben erwähnten Carcinoms.

Eine mitgeschnittene, größere (6 mm im Durchmesser) Lymphdrüse, dem Ileumanteile der Klappe zugehörig, zeigt histologisch bis auf Erscheinungen akuter Entzündung keine Veränderungen.

Bakterien lassen sich in reichlicher, stellenweise in enormer Menge nachweisen. Während aber auf der Oberfläche der veränderten Schleimhaut neben Bacillen verschiedener Dicke auch Kokken nachweisbar sind, finden sich im Gewebe selbst, und zwar in der ganzen Darmwand, Bacillen von einheitlichem Aussehen, die im großen und ganzen jenen Formen gleichen, wie wir sie früher bei den Muskelveränderungen beschrieben haben. Sie sind gleichfalls grampositiv und zeigen in der Mucosa und Submucosa vorwiegend kürzere Formen, jedoch reichlicher Sporenbildung, in der Muscularis aber auffallend reichlich kürzere und längere, meist gewundene Fäden. Die Bacillen finden sich in großer Menge auch im lymphatischen Gewebe der Darmschleimhaut, am Rande der Gasblasen und vor allem auch im Carcinomgewebe, sowohl zwischen den Schläuchen als auch in diesen selbst. Besonders reichlich ist ihre Menge an der Oberfläche des Carcinoms und in den seitlichen Randpartien desselben.

Auch in der mitgeschnittenen Lymphdrüse finden sich, wenn auch spärlich, ähnliche Bacillenformen.

6) Schnitte durch die Bauchwand aus der Umgebung des perityphlitischen Abscesses zeigen zunächst eine dem Peritoneum aufgelagerte verschieden breite Schicht fibrinös-eiterigen Exsudates. Das Fibrinnetz dieser Exsudatmembran ist stellenweise undeutlich und dann mehr schmutzigrot (Eosin) gefärbt, in den Maschenräumen desselben finden sich verschieden reichlich meist mehrkernige Leukocyten, deren Kerne dunkel gefärbt erscheinen oder schon ausgesprochenen Zerfall zeigen und Kernreste. In den tieferen Schichten der Exsudatmembran finden sich streckenweise auch rote Blutkörperchen eingestreut. Der endotheliale Ueberzug des Peritoneum ist nicht sichtbar, letzteres sowie das subperitoneale Binde- und Fettgewebe teils von ein- und mehrkernigen Leukocyten, teils von einem zarten Fibrinnetz mit spärlichen mehrkernigen Leukocyten durchsetzt. Stellenweise finden sich auch hier im Exsudate rote Blutkörperchen, mitunter in größeren Herden. An den nicht entzündlich veränderten Stellen erscheint das Bindegewebe selbst ziemlich kernarm, die sichtbaren Kerne sind oft schwächer tingiert, die Bindegewebsbündel wie gequollen und schollig zerfallen. Vereinzelt findet man im Peritoneum und dem aufliegenden Exsudate runde und leere Hohlräume ohne eigene Wandungen. Das mitgeschnittene Muskelgewebe zeigt die Kerne im allgemeinen noch erhalten, die Querstreifung der Muskelfasern ist jedoch undeutlich oder schon ganz verloren gegangen, die Fasern selbst quer zerfallen oder der Länge nach aufgefasert. Häufig findet man die Muskelfasern auseinandergedrängt durch eine homogene, mit Eosin lichtrot gefärbte Masse, seltener durch leere unregelmäßige Räume. Dieselbe homogene Masse ist auch im subperitonealen Binde- und Fettgewebe zwischen den Fettläppchen und Bindegewebsbündeln sichtbar.

In der dem Peritoneum aufliegenden Exsudatmembran findet sich ein Bakterien-gemege, vorwiegend bestehend aus grampositiven Kokken und kleineren gramnegativen Bacillen. Spärlicher sieht man darin Bacillen, die in allem den sub 1) beschriebenen gleichen. Im peritonealen und subperitonealen Bindegewebe ist das Bakterienbild jedoch ein einheitliches: es finden sich ausschließlich ziemlich schlanke grampositive unegliederte Fäden, oft von auffallender Länge und meist gewunden, wie sie auch im oberflächlichen Exsudate in spärlicher Menge zu finden sind. Dieselben langen Formen sieht man auch im Muskelgewebe zwischen den Muskelfasern, daneben aber auch noch kürzere, sonst gleich aussehende Formen.

Im Vordergrund des Interesses unseres Falles stehen zweifellos die Veränderungen, die wir an der Haut, dem Unterhautbinde- und Fettgewebe und der Muskulatur des unteren Rumpfteiles und der unteren Extremitäten vorgefunden haben.

Grob anatomisch waren diese Veränderungen an der Leiche gekennzeichnet durch bläulich-rote Färbung der Haut mit Blasenbildung und fetzenartiger Abschilferung in den abhängigen Körperpartien, durch Gasbildung in der Subcutis und Muskulatur, durch Blutungen in den Muskeln, sowie teilweiser Durchtränkung dieser und des subkutanen Gewebes mit fleischwasserähnlicher, gashaltiger Flüssigkeit.

Von diesen Veränderungen war Gasbildung, wir wie aus der Krankengeschichte entnehmen, schon *intra vitam* mit Sicherheit nachweisbar (Luftpolstergefühl und Gasknistern), desgleichen bläuliche und weißliche Färbung der Haut in der rechten Glutäalgegend und am rechten Oberschenkel (Nekrose). Dazu gesellen sich noch die Blutungen, die von vorneherein nur als vital entstanden anzusehen sind.

Es ist aber gleichfalls feststehend, daß der *in vivo* begonnene Prozeß auch nach dem Tode noch Fortschritte machte, denn die 8 Stunden *post mortem* ausgeführte Sektion ergab eine wesentliche Verschiebung der Grenzen in den Veränderungen gegenüber dem beim Exitus erhobenen Befunde (siehe Sektionsbefund und Krankengeschichte).

Nur darüber gibt uns die Krankengeschichte keinen Aufschluß, ob die im Sektionsbefunde beschriebenen, so schweren und ausgedehnten Veränderungen der Haut und die mächtige Durchtränkung der Cutis, Subcutis und Muskulatur auch noch während des Lebens entstanden sind oder als rein postmortale Erscheinungen gedeutet werden müssen. Der Umstand jedoch, daß schon ca. 3 Stunden *ante mortem* Nekrose der Haut sicher zu konstatieren war, daß ferner die schwersten Veränderungen in *cadavere* gerade dort zu finden waren, wo schon *in vivo* Nekrose und Gasblasen nachgewiesen werden konnten, und daß schließlich gerade in diesen Partien — abgesehen von den Blutungen — die mächtige serös-hämorrhagische Durchtränkung der Subcutis und Muskulatur auffiel gegenüber dem fast völligen Fehlen derselben in den sicher postmortal veränderten Stellen, läßt wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit die Annahme zu, daß auch von diesen Veränderungen ein Teil noch während des Lebens entstanden sein dürfte.

Die zweifelsohne *post mortem* erst veränderten Teile zeigten nur Gasbildung und diese um so oberflächlicher, je jünger die Veränderung war. War Gas an solchen Stellen auch in den Muskeln nachweisbar, so zeigten diese ein mehr trockenes, fast wie gekochtes Aussehen. Doch dürfte es kaum angehen, daraus eine scharfe Grenzlinie zu konstruieren zwischen den *in vivo* entstandenen Veränderungen einerseits und den erst *post mortem* entstandenen andererseits. Diese Grenzlinie erscheint uns vielmehr verwischt.

Was die histologischen Veränderungen anbelangt, so treten

in den Vordergrund derselben die reichliche Anwesenheit von Gasblasen im subkutanen Gewebe und in der Muskulatur, sowie die schweren Veränderungen an den Muskelfasern und am Bindegewebe. Der meist ausgedehnte Kernzerfall beherrscht im Vereine mit Quellung und Zerfall vorwiegend der Muskelfasern oft mehr oder weniger vollständig das histologische Bild. Während aber diese Veränderungen an allen untersuchten Stücken bald stärker bald schwächer sichtbar sind, anscheinend ohne Unterschiede, ob nun die Stücke solchen Stellen entstammen, die sicher schon in vivo erkrankt waren oder solchen, die sich erst post mortem veränderten, findet man auffallend reichliche Durchtränkung des Gewebes (Oedemflüssigkeit) vorwiegend in den untersuchten Gewebspartien, die schon während des Lebens Veränderungen gezeigt haben und Blutungen überhaupt nur in diesen. Völlig in den Hintergrund treten diesen Veränderungen gegenüber solche, die histologisch wohl als entzündliche gedeutet werden müssen. Es sind dies gewöhnlich kleinere Anhäufungen von ein- und mehrkernigen Leukocyten, meist mit ausgesprochenem Kernzerfall. Diese entzündlichen Herde sind aber, wie schon hervorgehoben wurde, immer nur klein und fehlen in der Mehrzahl der untersuchten Präparate überhaupt. Daß sie nur als vital entstanden anzusehen sind, bedarf keiner weiteren Erörterung.

Als Ursache der geschilderten Veränderungen erkannte die bakteriologische Untersuchung ein streng anaërobes, sporenbildendes Bakterium, dessen genauere morphologische kulturelle und tierpathogene Eigenschaften später ausführlicher beschrieben werden sollen. Dieses Bakterium war in reichlicher Menge und ausschließlich vorhanden. Weder durch anaërobe noch durch aërobe Züchtung konnte ein anderer Mikroorganismus nachgewiesen werden und die mit den Originalkulturen später wiederholt ausgeführte Prüfung auf die Reinheit der Kultur ergab immer nur die eine Bacillenart. Damit stimmte auch das Ergebnis der Deckglaspräparatbefunde und der histologischen Untersuchung überein. Es handelte sich also in unserem Falle um eine sichere Reininfektion.

Die Eingangspforte für den Bacillus bildete zweifelsohne der Darm, in dessen Inhalt mikroskopisch morphologisch und färberisch analoge Bakterienformen nachgewiesen werden konnten, und zwar der durch das zerfallene Carcinom veränderte Teil desselben (Ileocökal-klappe). Das exulcerierte Carcinom hatte zunächst zu lokalen Veränderungen in der Umgebung der Klappe geführt, welche schließlich die in der Leiche gefundenen Adhäsionen und zirkumskripten entzündlichen Erscheinungen der Peritonealwand zur Folge hatten. Dadurch war nunmehr die Möglichkeit einer Infektion per continuitatem mit dem gefundenen Bacillus gegeben.

Zu welcher Zeit nun diese erfolgte, darüber lassen sich bestimmte Angaben allerdings nicht machen. Die zeitlich älteste Veränderung war dem pathologisch-anatomischen Befunde nach zweifelsohne die vom Carcinom aus entstandene Perityphlitis, die zeitlich jüngste der Gasbrand, der zuerst ca. 6 Stunden vor dem Tode beobachtet wurde, und dem nahezu sichtbaren foudroyanten Fortschreiten nach zu schließen, auch nicht allzulange vorher seinen Anfang genommen hatte. Wie alt die allgemeine, durch ein Bakteriengemenge bedingte Peritonitis war, läßt sich mangels ausgesprochener klinischer Erscheinungen genau nicht feststellen, doch geht aus dem anatomischen Bilde soviel wohl unzweifel-

haft hervor, daß sie früher als der Gasbrand entstanden war, wenn auch nicht längere Zeit vorher; ja, es ist sogar die Deutung nicht von der Hand zu weisen, daß die Peritonitis das auslösende Moment für die Gasbrandinfektion bildete.

Gleichfalls unsicher festzustellen ist der Weg, welchen die Gasbrandinfektion, nachdem sie einmal manifest war, eingeschlagen hat. Sicher ist nur, daß an der rechten Gesäßbacke die ersten Zeichen der Gasbrandinfektion nachzuweisen waren und dadurch gewinnt die Annahme eine gewisse Wahrscheinlichkeit, daß vielleicht das Foramen ischiadicum den Weg für den Durchbruch der Infektion aus der Beckenhöhle nach außen gebildet haben dürfte.

Auf den bemerkenswerten stürmischen Verlauf der Gasbrandinfektion noch in vivo haben wir bereits hingewiesen.

Der sowohl makroskopisch anatomisch als auch histologisch erhobene Befund von Gasblasen im Herzen und den größeren Gefäßen und damit übereinstimmend der Nachweis des Gasbranderregers im Blute — ist selbstverständlich nicht als vitaler, sondern als postmortaler Prozeß aufzufassen. Dabei fehlen aber Schaumorgane völlig, was vorläufig einfach als Tatsache hingestellt sein mag.

Morphologisches und färberisches Verhalten. Der gefundene Mikroorganismus ist ein Bacillus, ausgezeichnet durch große Mannigfaltigkeit seiner Formen, mit echten Verzweigungen, beweglich, mit endogenen Sporen, im allgemeinen mit den gebräuchlichen Farbstoffen leicht sich färbend und grampositiv.

Die einfachste Form ist die eines geraden Stäbchens verschiedener Größe. Neben fast kokkenähnlichen kurzen Bacillenformen, die kaum 1μ im Längsdurchmesser halten, aber seltener zu finden sind, sieht man alle Größenübergänge bis zu solchen, anscheinend noch aus einem Individuum bestehenden Formen, die $5-6 \mu$ und darüber lang sind. Von diesen längeren Stäbchenformen gibt es nun alle Uebergänge bis zu oft sehr langen Fadenformen, die zum Teil gerade sind, häufiger aber mehr oder weniger stark gewunden oder geschlängelt erscheinen. Die gebildeten Fäden sind meist ungegliedert, weniger häufig gegliedert. Gekrümmte Formen finden sich übrigens auch bei den kürzeren Stäbchen. Die Breite der beschriebenen Formen beträgt zumeist ca. $0,8 \mu$. Doch zeigen alle diese Formen auch mehr oder weniger starke Abweichungen von der angegebenen Breite. Man findet einerseits schmalere, kürzere und längere Formen bis zu oft außerordentlich dünnen Gebilden, die besonders dann auffallen, wenn sie längere Fäden darstellen, andererseits findet man auch dickere Formen bis zu solchen, die den früher angegebenen Breitendurchmesser fast um das Doppelte überschreiten. Alle diese Formen können nun entweder gleichmäßig breit sein oder aber man findet größere und kleinere Unregelmäßigkeiten in der Breite, indem im Verlaufe der Bacillen oder Fadenformen die Begrenzungslinien der Längsseiten nicht strenge gerade verlaufen. Die Enden sind abgerundet. Neben diesen Formen findet man solche, die mehr oder weniger deutlich Auftreibungen zeigen. Betreffen diese kleinere Formen, so erscheinen letztere wie angeschwollen, gebläht. In längeren Formen oder Fäden liegen diese Auftreibungen entweder mehr in der Mitte des Gebildes oder aber dem einen oder anderen Polende nahe; dadurch kommen Formen zustande, die einerseits ein mehr spindelförmiges Aussehen

zeigen, andererseits birnförmige oder keulenförmige Gebilde darstellen (No. 16, Taf. II). Vielfach sind diese Auftreibungen besonders stark ausgebildet und die dadurch entstandenen Formen auffallend groß, fast unförmig. Kürzere Formen bekommen dadurch oft ein Aussehen, das man am besten als *Distomum*-ähnlich¹⁾ bezeichnen kann. Nicht selten erscheinen diese Formen unscharf begrenzt. Betreffen diese Auftreibungen gegliederte Fäden, die aus kurzen Formen bestehen, so erhalten diese ein Rosenkranz-ähnliches Aussehen.

Seltener findet man sowohl an kürzeren wie an längeren Bacillen- und Fädenformen echte Verzweigungen, Ast-, Dorn-, Sporn- oder Y-artig, wodurch verschiedenartig aussehende, oft geweihähnliche Formenbilder entstehen (No. 14, Taf. I).

Häufig sind in den Präparaten (vom Menschen, Tieren und Kulturen) Sporen zu finden. Diese zeigen länglich-ovale Form und verschiedene Größe. Sie liegen entweder in der Mitte des Bacillus (mittelständig) oder dem einen oder anderen Pole nahegerückt (polständig), dabei oft nur von Resten des Bacillus umgeben, oder sie sind völlig frei. Meist sind es die kurzen Stäbchenformen, die Sporen zeigen (No. 11, Taf. I). Dieselben sind in ihrem Breitendurchmesser dann entweder ganz unverändert oder der sporentragende Teil ist mehr oder weniger ausgebaucht. Seltener findet man Sporen in ungliederten, meist dünneren Fäden, polständig an einem oder beiden zumeist leicht aufgetriebenen Enden, oder in größeren angeschwollenen Formen und dann gewöhnlich einem Pole derselben nahegerückt.

Bei geeigneter Untersuchungsmethode zeigt der Bacillus lebhaft e Eigenbewegung.

Es gelingt leicht, mit der von Löffler angegebenen Methode für die Darstellung von Geißeln solche in großer Zahl an den Bacillen nachzuweisen. Die Geißeln sind seitenständig.

Was nun das Vorkommen der beschriebenen verschiedenen Formen anlangt und ihr Mengenverhältnis zueinander, so müssen wir im allgemeinen dasselbe als ein variables bezeichnen. In den Präparaten des untersuchten Falles (Muskelsaft, Mensch) fanden sich vorwiegend kurze Formen und reichlich Sporen, letztere allerdings nur in den Präparaten aus älter erkrankten Partien (No. 11, Taf. I). In den Präparaten aus den erkrankten Randpartien ließen sich Sporen nicht nachweisen (No. 12, Taf. I). Im Tierkörper war das Verhalten ein verschiedenes: In der subkutanen Oedemflüssigkeit von Meerschweinchen fanden sich meist gerade oder gewundene, kürzere oder längere Formen mit wechselnden Sporenmengen. In den Schnittpräparaten von diesen Tieren waren im Bereiche der veränderten Muskeln hingegen auffallend lange, gewundene Fäden zu finden (ähnliches war auch in den Schnitten vom *M. ileo-psoas* des Menschen zu sehen). Besonders lange Formen zeigten auch die Präparate von Peritonealsaft der subkutan geimpften Tiere (Meerschweinchen, auch Maus). Sehr reich an Sporen und angeschwollenen Formen waren die Präparate vom Muskelsaft der intramuskulär geimpften Tauben (No. 13, Taf. I). In den Kulturen sah man manchmal ein oder die andere Form mehr oder weniger vorherrschen, Sporen oft völlig fehlen, doch fand sich andererseits in ein und derselben Kultur nicht selten ein Gemenge aller beschriebenen Formen ohne Vorherrschen einer Art. Ja, in Oberflächenkulturen fanden sich gar nicht so selten

1) *Distomum hepat.*

in einer Kolonie alle die beschriebenen verschiedenen Formen bunt untermengt vor, manchmal auch in der Weise, daß die Randpartieen kürzere und längere, gerade und geschwungene Formen, die zentralen Partieen hauptsächlich *Distomum*-ähnliche, große und geblähte Formen und Sporen, neben detritusähnlichen Massen zeigten (No. 17 u. 18, Taf. II). Auffällig reichlich war die Sporenbildung in Serum- und Stärkeagarkulturen (1 ‰).

Aus unseren Versuchen, in den Kulturen durch Zusatz verschiedener Substanzen zum gewöhnlichen Nähragar (wie Traubenzucker, ameisen-saures Natrium, Glycerin, Kombinationen dieser Substanzen, Erhöhung des Kochsalzgehaltes u. a.) Anhaltspunkte zu gewinnen für das verschiedene morphologische Verhalten des Bacillus, konnten wir ersehen, daß, abgesehen von dem Alter der Kulturen und dem Feuchtigkeitsgehalte des Nährbodens (Oberflächenkulturen), die Zusammensetzung desselben für die Formen des Bacillus nicht ohne Belang sei; denn wir fanden z. B. in einer Versuchsreihe mit Oberflächenkulturen, in welcher dieselbe Ausgangskultur benützt wurde und die Agarplatten unter sonst völlig gleichen Bedingungen gehalten wurden, daß bei Zusatz von Traubenzucker (1 Proz.), sei es allein, sei es im Vereine mit anderen Substanzen, sich meist auffallend viele und lange Fäden vorfanden, während auf gewöhnlichem Agar ohne weiteren Zusatz oder auf letzterem mit Glycerin (2 Proz.) sich sehr reichlich Sporen und große, geschwollene, *Distomum*-ähnliche Formen vorfanden. Andererseits sahen wir in einer zweiten Versuchsreihe mit Oberflächenkulturen, bei welcher verschiedene Ausgangskulturen verwendet wurden, jedoch derselbe Nährboden, daß die Formen in den einzelnen Kulturen sowohl in Bezug auf Verschiedenheiten der Formen als auf gegenseitige Mengenverhältnisse keine auffälligen Unterschiede zeigten. Wir möchten jedoch aus diesen unseren Versuchen keinerlei bestimmte Schlüsse ziehen, da wir aus der außerordentlich großen Menge von Präparaten, die wir bezüglich des morphologischen Verhaltens unseres Bacillus durchstudierten, im allgemeinen feststehende Gesetzmäßigkeiten nicht ersehen konnten.

Die Lagerung der Bacillen zeigt keine gleichmäßige; sie liegen entweder vollständig regellos durcheinander, namentlich dann, wenn alle oder viele der beschriebenen Formen nebeneinander vorkommen, oder sie liegen parallel zu kleineren oder größeren gewundenen Strängen vereinigt. Letzteres gilt besonders für Oberflächenkolonien, in welchen zuweilen besonders lange gegliederte und ungegliederte Fäden vorkommen. Kleinere Formen zeigen mitunter auch verschieden stumpfe Winkelstellungen, wodurch dann, wenn gleichzeitig Anschwellung dieser Formen besteht, gekrümmte Formen vorgetäuscht werden können.

Der Bacillus färbt sich leicht mit den gebräuchlichen Anilinfarbstoffen, doch nicht gleichmäßig, indem meist neben gut und gleichmäßig tingierten Formen auch schwächer und undeutlich gefärbte bald reichlicher bald nur spärlich sichtbar sind.

Das Verhalten der Bacillen bei Anwendung der Gramschen Methode ist ein verschiedenes. Die Bacillen bleiben entweder gleichmäßig tief dunkelviolett tingiert (Gram-positiv) oder sie entfärben sich völlig und nehmen bei Nachfärbung mehr oder weniger intensiv die Kontrastfarbe an (Gram-negativ) oder sie zeigen endlich ein unausgesprochenes Verhalten, indem sie sich einerseits nur schwach violett tingieren und dann bei Nachfärbung mit Fuchsin einen rötlich-violetten Ton annehmen, andererseits neben ausgesprochen dunkelviolett gefärbten Partieen solche

zeigen, die die Kontrastfarbe angenommen haben (Uebergangsformen). Und zwar zeigten die gleichmäßigen, kürzeren und längeren Bacillenformen gewöhnlicher Dicke Gram-positive, seltener Uebergangsfärbung. Auch die dickeren Formen, sowohl die kürzeren als auch längeren, erschienen meist Gram-positiv oder zeigten Uebergangsfärbung, nur selten waren sie Gram-negativ. Die dünneren Stäbchen und Fäden zeigten sich vorwiegend Gram-negativ und dabei häufig auch mit der Kontrastfarbe schwächer färbbar (Degenerationsformen). Verschieden verhielten sich auch die früher beschriebenen angeschwollenen Formen: während die kleineren entweder ausgesprochen Gram-positiv oder Gram-negativ waren, seltener Uebergangsfärbung aufwiesen, erschienen die größeren angeschwollenen Formen zumeist eigentümlich schwach violett und dabei ungleichmäßig gefärbt, oft mit intensiv gefärbten, körnchenartigen Einlagerungen (Taf. II, No. 18), nur selten verhielten sie sich mehr oder weniger ausgesprochen Gram-negativ, vereinzelt aber auch deutlich und intensiv Gram-positiv.

Was nun das Mengenverhältnis der Gram-positiven und Gram-negativen sowie der Uebergangsformen zueinander betrifft, so können wir mit Sicherheit das eine behaupten, daß das Alter der Kulturen und bei Tierexperimenten die Erkrankungsdauer für dieses Verhalten ausschlaggebend sind: je jünger der Bacillus, um so sicherer und um so intensiver bleibt er bei Anwendung der Gramschen Methode tief dunkelviolett, je älter, um so eher entfärbt er sich. Wir müssen demnach unseren Bacillus als einen Gram-positiven bezeichnen und können durch Anwendung dieser so wichtigen Färbungsmethode gewisse Anhaltspunkte für das Alter der Bacillen und damit für seine Degenerationsformen gewinnen.

Die vorher erwähnten, auffallend dünnen und langen Formen verhielten sich fast ausnahmslos Gram-negativ und nahmen häufig auch die Kontrastfarbe nur schwach an; wir können sie deshalb wohl als Degenerationsformen bezeichnen. Desgleichen sieht man auch unter den angeschwollenen großen *Distomum*-ähnlichen Formen oft solche, die völlig Gram-negativ sind oder nur schwach violett gefärbt erscheinen; auch diese Formen möchten wir als Degenerationsformen ansprechen, ohne Bestimmtes darüber aussprechen zu können, ob diese Gebilde mit der Sporenbildung in einen direkten Zusammenhang zu bringen sind oder nicht.

Bei Behandlung der Präparate mit Jod (Lugolsche Lösung oder Jodtinktur) zeigte sich ein verschiedenes Verhalten der Bakterien. Häufig nahmen sämtliche Bacillenformen des Präparates eine gleichmäßig hellgelbe Färbung an. In anderen Präparaten wieder fanden sich neben hellgelben Formen mehr oder weniger zahlreich solche, die Braunfärbung zeigten. Die Braunfärbung zeigte verschiedene Abstufungen von hellbraun bis dunkelbraun, in einzelnen Fällen war die Färbung eine fast schwarze. Dabei waren die Bacillen entweder gleichmäßig oder aber fleckigbraun gefärbt. Alle diese Verschiedenheiten kamen sehr häufig gleichzeitig in den Präparaten zum Ausdruck und brachten im Verein mit den vielgestaltigen Formen der Bacillen ein wechselvolles Bild hervor: So konnte man neben längeren und kürzeren, gleichmäßig hellgelben Bacillen und Fäden solche mit verschieden stark braun gefärbten Flecken sehen, sowie solche, die gleichmäßig braun gefärbt waren. Die fleckig braun gefärbten erhielten öfters dadurch, daß stärker braun gefärbte Parteen mit ungefärbten, stärker lichtbrechenden mehr

oder weniger regelmäßig abwechselten, ein segmentiertes Aussehen. Oder man sah an kürzeren Bacillenformen den mittleren Teil braun gefärbt, an den beiden Enden aber je eine schmale, helle, glänzende Kuppe, an anderen wieder die Polenden braun, und nur die Mitte hell und glänzend. Aehnliche Bilder zeigten auch die geschwollenen Formen. Es sei jedoch hier besonders hervorgehoben, daß auch Stäbchen und aufgetriebene Formen, die sicher erkennbare Sporen zeigten, vielfach ohne jegliche Braunfärbung waren und gleichmäßig hellgelb gefärbt blieben, ja daß auch in Kulturen, die außerordentlich zahlreiche Sporen zeigten, jede Spur einer Braunfärbung fehlte. Andererseits sahen wir, was gleichfalls betont werden soll, daß in Kolonien von Oberflächenkulturen, die reichlich sporenlose, angeschwollene Formen neben reichlichen sporentragenden Stäbchen und freien Sporen zeigten, die Stäbchen gleichmäßig hellgelb erschienen, während die großen angeschwollenen Formen mehr oder minder intensiv, aber gleichmäßig braun gefärbt waren.

Eine Blaufärbung konnten wir in den mit Jod behandelten Präparaten niemals sehen, auch nicht in 48-stündigen und älteren Stärkeagarkulturen, welche übrigens auch Braunfärbung vermissen ließen.

Kapseln konnten wir trotz vieler Versuche weder in Kulturen noch im Tierkörper mit den gebräuchlichen Methoden für die Kapselfärbung mit Sicherheit nachweisen. Zuweilen aber sahen wir in Präparaten aus Kulturen, welche nach der Methode von Welch gefärbt waren, besonders deutlich in einer älteren Traubenzucker-Bouillonkultur, um die Bacillen lichte Höfe, mehr oder weniger deutlich durch einen Kontur begrenzt, und bei den in größeren Haufen gelagerten Formen die Einzelindividuen durch gleichmäßige Zwischenräume voneinander getrennt.

Durch Färbung mit essigsauerm Methylenblau konnten wir weder in Präparaten aus frischen Zuckeragarkulturen noch in solchen aus frischen Serumkulturen körnchenartige Einlagerungen darstellen.

Kulturelles und biochemisches Verhalten. Der beschriebene Bacillus ist ein strenges Anaërobion. Reinkulturen desselben wachsen niemals bei Anwesenheit von Sauerstoff.

Die nachstehende Beschreibung seiner kulturellen Eigenschaften bezieht sich demnach auf Kulturen, welche unter streng anaëroben Bedingungen angelegt und gehalten wurden.

1) Oberflächenkolonien in Plattenstrichkulturen (Agar mit 1—2-proz. Traubenzucker. Wasserstoffatmosphäre):

Das Aussehen der Kolonien ist ein verschiedenes. Gut isolierte Kolonien können manchmal rundlich oder völlig rund sein und erreichen dann dort, wo sie dichter stehen, ungefähr die Größe von Influenzokolonien. Stehen sie weiter voneinander ab, so werden sie auch größer, unter Umständen bis 2 mm im Durchmesser und darüber. Im auffallenden Lichte sind solche Kolonien zart grau oder weißlich-grau; im durchfallenden bläulich-grau. Bei Lupenvergrößerung erscheinen sie transparent: wasserhell bei gerader, moiréartig glänzend bei schiefer Beleuchtung. Größere runde Kolonien sind mehr weißgrau und zeigen steil abfallenden Rand (Taf. I, No. 2). Unter dem Mikroskop sind die Kolonien bei schwacher Vergrößerung mehr oder weniger erhaben, zart granuliert, fast farblos oder zart gelblich-weiß und zeigen leicht aufge-

faserten Rand. In diesen Formen sind sie oft nicht unähnlich Kolonien des *Diplococcus pneumoniae*.

Häufiger zeigen die Kolonien wellig begrenzten oder gebuchteten Rand. Auch in diesen Formen sind sie entweder mehr gleichmäßig flach und dann grau oder weißlich-grau und glänzend (Taf. I, No 1) oder sie zeigen mitunter ein etwas opakeres Zentrum. Letzteres hebt sich mitunter scharf als weißlicher, erhabener Teil von der flachen, grautransparenten, peripheren Zone ab (Taf. I, No. 3). Solche Kolonien sind in ihrer Form Pestkolonien ähnlich und zeigen mikroskopisch einen stärker bräunlich gefärbten, zentralen Teil, der sich deutlich von dem gebuchteten, fast farblos erscheinenden und zartest granulierten, peripheren Teil abgrenzt.

Je besser diese gebuchteten Kolonien isoliert sind, um so häufiger gewinnt der zentrale opaktere Teil an Ausdehnung, während die periphere, zarte Randpartie gleichzeitig mehr und mehr zurücktritt, bis schließlich Kolonienformen entstehen können, die fast gleichmäßig opak erscheinen. Zeigen derartige Kolonien eine annähernd rundliche Form und dabei einen gleichmäßig gebuchteten Rand, so gewinnen sie ein rosettenartiges Aussehen (Taf. I, No. 4). Ist hingegen die Form eine unregelmäßige, der Rand ungleichmäßig und verschieden tief gebuchtet, so erhält die Kolonie ein blattförmiges Aussehen. Mikroskopisch erscheinen solche Kolonien mehr oder weniger gleichmäßig bräunlich und bei stärkerer Vergrößerung erkennt man an den verschieden tief gebuchteten Randpartien die ziemlich dicht gefügten Bacillenformen, meist nur vereinzelt weiter in die Umgebung vorragend.

Werden die Einbuchtungen an den Randpartien noch unregelmäßiger, die dadurch entstandenen kleineren und größeren Segmente ausläuferartig und zackig, so entstehen Kolonienformen, die wie zerschlossen aussehen. Auch solche Kolonien können mehr gleichmäßig flach sein (Taf. I, No. 5) oder aber ein größeres oder kleineres opakeres Zentrum zeigen, das sich mehr oder weniger gut abhebt (Taf. I, No. 6).

Oder man sieht endlich größere, fast blattförmig aussehende Kolonien, gleichmäßig flach und grau im auffallenden und durchfallenden Lichte mit ziemlich regelmäßigen, wenig tiefen Einbuchtungen am Rande, der nicht selten etwas opaker erscheint und wieder korallenriffartig gestaltete kürzere Fortsätze aussenden kann. Von letzteren gehen manchmal noch feinere Ausläufer ab, die dendritisch verzweigt sind und wie Bäumchen diesen korallenriffartigen Fortsätzen aufsitzen (Taf. I, No. 7). Sie verleihen den Kolonien ein äußerst zierliches Aussehen. Mikroskopisch erscheinen solche Kolonien flach, licht gelblich, in den Randpartien oft etwas dunkler und gröber gekörnt, die bäumchenartigen Ausläufer als ein dendritisch verzweigtes Geflecht zarter, fast strukturloser Ausläufer, die nach außen zu immer zarter werden.

Zwischen allen den im vorhergehenden geschilderten Kolonienformen gibt es nun Uebergänge, so daß die Mannigfaltigkeit der oberflächlichen Kolonienformen eine recht große ist. Manchmal finden sich mehr oder weniger alle diese Formen auf einer Platte zusammen vor, häufiger jedoch sieht man eine oder die andere der Formen vorherrschen.

Die Mannigfaltigkeit des Formenreichtums in den Kolonienbildern wird aber noch dadurch erhöht, daß vielfach die Kolonien zusammenfließen, bald zu größeren, bald zu kleineren unregelmäßigen Gebilden

(Taf. I, No. 9). Dadurch entstehen proteusartige, häufig auch moosartige oder eisblumenähnliche größere und kleinere, flache Rasen. In Platten mit Koloniefenformen, die bäumchenartige Ausläuferbildung zeigen, sieht man aus dem Zusammenfließen dieser Ausläufer jenen zarten, diffusen Ueberzug hervorgehen, der sich manchen Kolonien anschließt und oft einen größeren oder kleineren Teil der Nährbodenoberfläche bedeckt (Taf. I, No. 8).

Die Ursache dieses verschiedenen Aussehens der Oberflächenkolonien dürfte keine einheitliche sein. Zweifellos spielt aber der Feuchtigkeitsgehalt der Oberfläche des Nährbodens dabei keine unwichtige Rolle. Auch die Beweglichkeit des Bacillus muß dabei berücksichtigt werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist diese nicht immer eine gleichmäßige. Für diese letztere Annahme sprechen unsere vielen einschlägigen Beobachtungen über die Beweglichkeit dieses Bakteriums in Kulturen und im Tierkörper. Je feuchter demnach der benutzte Nährboden und je besser beweglich der ausgesäte Stamm, um so vielgestaltiger die Formen, die aus der Aussaat angehen — mit allen Uebergängen bis zu jenen Platten, die eine Isolierung von Kolonien überhaupt nicht mehr erkennen lassen, sondern mit einem gleichmäßig zarten, grauglänzenden Ueberzug in toto bedeckt erscheinen. Je trockener hingegen die Platten und je weniger beweglich der ausgesäte Stamm, um so besser erscheinen die Kolonien isoliert und um so mehr nähern sie sich den eingangs geschilderten rundlichen Formen.

Änderungen in der Zusammensetzung des Nährbodens nach der Richtung hin, daß man eine andere reduzierende Substanz als Zusatz benutzt oder diese überhaupt wegläßt, scheinen für das verschiedene Aussehen der Oberflächenkolonien keine oder zum mindesten keine nennenswerte Bedeutung zu haben. Wir erhielten in unseren Versuchen keine anderen Resultate, wenn wir an Stelle von Traubenzucker (1 bis 2 Proz.) ameisensaures Natron (0,3 Proz.), Milch- oder Rohrzucker (1 bis 2 Proz.) oder Glycerin (2 Proz.) verwendeten. Auch ein Gemenge der genannten Substanzen in verschiedener Kombination war nach dieser Richtung hin ohne Einfluß, desgleichen das vollständige Fehlen jeder reduzierenden Substanz.

4 Das Bild der Koloniefenformen änderte sich auch nicht, wenn wir für die Aussaat an Stelle der oben genannten Nährböden Blutagar-Nährböden nach R. Pfeiffer oder Serumagar (Agar mit Zusatz von serumhaltiger Flüssigkeit) benutzten. Nicht einmal die Ueppigkeit der Kolonien wurde dadurch wesentlich beeinflußt.

2) Tiefenkolonien in Plattenkulturen mit Traubenzuckeragar.

Die Kolonien zeigen verschiedene Größe. Bei Lupenbetrachtung erscheinen sie unregelmäßig, mit längeren und kürzeren Ausläufern, grau, in den zentralen Partien leicht bräunlich. Unter dem Mikroskop sind sie bei schwacher Vergrößerung bräunlich-gelb mit schwärzlichem Stich, teils maulbeerartig, vorwiegend aber mit verschieden geformten und verschieden langen Ausläufern versehen. Diese sind mitunter zackig und zeigen oft rundliche oder ovale Anschwellungen.

3) Stichkulturen in Agar mit 1 Proz. Traubenzucker (mit Ueberschichtung).

Schon nach 8 Stunden kann entlang dem Impfstiche sich Wachstum in Form eines zarten, grau-transparenten Bandes zeigen (Stich mit der Oese). Tritt schon bald nach dieser Zeit — ungefähr zwischen 16

bis 18 Stunden — Gasbildung ein, so erfolgt diese meist stürmisch. Der Agar wird dadurch mehr oder weniger stark zerrissen, zeigt reichlich Gasblasen und am Boden der Eprovette sammelt sich stark getrübe Flüssigkeit an. Der Impfstich, der durch die Gasentwicklung vielfach auseinandergerissen ist, hat inzwischen an Ueppigkeit etwas zugenommen und zeigt nunmehr ein mehr weißlich-graues Aussehen im durchfallenden Lichte.

Zuweilen aber erfolgt die Gasbildung viel später und weniger stürmisch. Dadurch gewinnt der Impfstich in solchen Kulturen an Ueppigkeit gegenüber den oben beschriebenen und zeigt sich als ein grauweißes Band, welches an den Randpartien leicht unregelmäßig begrenzt erscheint.

In nicht überschichteten Traubenzuckeragar-Stichkulturen ist das Wachstum ein gleiches wie in den überschichteten, nur beginnt dasselbe erst ungefähr $1-1\frac{1}{2}$ cm unterhalb der Oberfläche, kann aber später allmählich noch etwas gegen die Oberfläche zu fortschreiten, um ca. $1-1\frac{1}{2}$ cm von derselben entfernt, dauernd Halt zu machen. Niemals beobachteten wir in solchen Kulturen Wachstum auf der Oberfläche.

4) Schüttelkulturen in Agar mit 1 Proz. Traubenzucker.

Das Aussehen dieser Kulturen ist ein verschiedenes und richtet sich nach der Dichte der Aussaat. Stark beschickte Kulturen zeigen mehr oder weniger stürmische Gasentwicklung und diffuses Wachstum. In entsprechend verdünnten Kulturen können isolierte Kolonien einen Durchmesser von 3—4 mm erreichen und darüber. Gewöhnlich sind sie aber nur ca. stecknadelkopfgroß. Die Einzelkolonien erscheinen bei makroskopischer Betrachtung rundlich, nicht scharf begrenzt, wolkenartig. Bei Lupenvergrößerung sieht man einen kleinen zentralen, bräunlichen Kern und eine größere periphere Zone, die sich in ein dichtes, unregelmäßig radiär angeordnetes Fadenwerk auflöst. In solchen Kulturen mit gut isolierten größeren Kolonien unterbleibt nicht selten die Gasbildung vollständig oder tritt sehr spät ein. Ueppig entwickelte Zuckeragarkulturen rochen schwach nach Buttersäure. War die Gasbildung eine besonders stürmische, so konnte man das in der zersprengten Agarsäule angesammelte Gas an der Flamme unter zischendem Geräusch verbrennen.

Stich- und Schüttelkulturen in gewöhnlichem Agar zeigen im allgemeinen kein abweichendes Verhalten von den Stich- und Schüttelkulturen in Agar mit 1-proz. Traubenzucker, ebenso nicht Stich- und Schüttelkulturen in Agar mit 2-proz. Traubenzucker, Milch- und Rohrzucker. Nur schien es uns, als ob die Entwicklung in den Kulturen mit Rohrzuckerzusatz am wenigsten üppig erfolgte.

5) Oberflächenkulturen in Gelatineplatten, bei 18 bis 21° C durch 7 Tage unter Wasserstoffatmosphäre gehalten.

Die Kulturen wurden für diesen Zweck teils als Oberflächenstrichkulturen angelegt, teils derart, daß mit einer Oese das Material auf die Oberfläche in entsprechenden Abständen aufgetupft wurde. In allen Platten erfolgte Wachstum, welches sich bei Betrachtung mit freiem Auge zunächst durch Verflüssigung der besäten Nährbodenoberfläche kundgab. Die Verflüssigung erfolgte langsam und bewirkte dadurch seichte, rundliche oder strichförmige Vertiefungen. Bei Lupenvergröße-

zung zeigte sich innerhalb dieser verflüssigten Partien eine schleierartige Trübung und bei mikroskopischer Betrachtung (Zeiss A, Ok. 4) sah man entsprechend dieser Trübung granuliert Massen, welche sich bei stärkerer Vergrößerung (Zeiss C, Ok. 4) als Bacillen und Sporen zu erkennen gaben.

6) Tiefenkolonien in Gelatineplatten (ohne Zuckerzusatz, Wasserstoffatmosphäre, 18° C).

Je nach der Dichte der Aussaat sind die Kolonien verschieden groß. Stehen sie dichter gesät, so sind sie meist unregelmäßig, sind sie gut isoliert, so zeigen sie rundliche oder scheibenartige Formen und werden ca. stecknadelkopfgroß und darüber. Bei Lupenbetrachtung sieht man einen bräunlichen Kern und eine mehr schleierartige, periphere Zone, die ohne scharfe Grenze sich in der Umgebung verliert. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigen die Kolonien ein verschiedenes großes, gelbbraunes Zentrum, dem zunächst eine etwas hellere, aber gleichfalls noch gekörnt aussehende Zone folgt, die dann in eine breitere Randpartie übergeht. Diese besteht aus dichtgefügt, radiär ausstrahlenden, im allgemeinen gerade verlaufenden Fäden, welche strahlenkranzartig die zentralen Partien umgeben. Einzelne dieser ausstrahlenden Fäden sieht man besonders weit in die Umgebung vorragen. Diese Strahlenzone fehlt an manchen Kolonien vollständig.

Die Kolonien in Gelatine mit 1-proz. Traubenzucker zeigen im allgemeinen dieselben Formen, nur findet man häufig die zentralen Partien der Kolonie von einer Gasblase eingenommen, deren Peripherie von dem beschriebenen Strahlenkranz auslaufender Fäden umgeben wird.

7) Stichtkulturen in Gelatine (10-proz. Gelatine, Ueberschichtung mit Agar, ca. 20° C).

Schon nach 3—4 Tagen findet man Entwicklung entlang dem Impfstiche, bestehend in einer dichten, schleierartigen Trübung, oft unterbrochen von etwas dichten, wolkenartigen Einzelkolonien. Oder aber man sieht vom Impfstich nach allen Seiten zarteste büschelförmige Ausläufer ausstrahlen. An jenen Stellen des Impfstiches, an welchen sich das Wachstum in Einzelkolonien auflöst, findet man die zarten, büschelförmigen Ausläufer von unregelmäßigen, schleierartigen oder aber glänzenden, scheibenförmigen, zentralen Gebilden ausstrahlen. Nach 7 bis 8 Tagen, manchmal auch schon früher, erfolgt Gasbildung und von oben nach unten zu fortschreitende Verflüssigung, die weiterhin allmählich zunimmt, bis schließlich nach mehreren Wochen (ca. 3—4) die ganze Kultur verflüssigt wird.

In Gelatinestichtkulturen mit Zusatz von 1 Proz. Traubenzucker ist das Wachstum ein ähnliches.

8) Schüttelkulturen in Gelatine (10 Proz.) ohne Ueberschichtung, bei 20° C gehalten, zeigen ebenfalls nach 3—4 Tagen, ungefähr Fingerbreite unterhalb der Oberfläche beginnend, Wachstum. Bei dichter Aussaat erkennt man nach dieser Zeit eine zarte, schleierartige Trübung, welche sich bei Lupenbetrachtung entweder in mehr oder weniger gleichmäßig verteilte, kleinste, wolkenartig aussehende Kolonien von meist unregelmäßiger Form auflöst oder man sieht kleine, glänzende, scheibenartige Kolonien, von deren Randpartien äußerst zarte Fäserchen büschelförmig ausstrahlen. Nach und nach erfolgt auch in diesen Kulturen analog den Stichtkulturen Verflüssigung der Gelatine.

Bei sehr spärlicher Aussaat können sich in der Gelatine langsam

Kolonien entwickeln, die sehr groß werden und ihrem Aussehen nach völlig denen gleichen, welche wir vorher bei den Agarschüttelkulturen beschrieben haben. Man bezeichnet solche Kolonien am besten als „distelblumenartige“. Bei so isolierten Kolonien konnten wir Verflüssigung auch bei längerer Beobachtungsdauer nicht bemerken.

Gelatineschüttelkulturen mit Zusatz von 1 Proz. Traubenzucker oder 0,3 Proz. a.meisensaurem Natron oder 0,3 Proz. a.meisensaurem Natron und 1 Proz. Traubenzucker zeigen im allgemeinen keine Abweichungen von den Kulturen in gewöhnlicher Gelatine.

Das Verhalten der Gelatinekulturen bezüglich der Verflüssigung ist demnach kein gleichmäßiges. Aber nicht bloß die verschiedene Dichte der Aussaat ist dabei von Einfluß, sondern auch der Prozentgehalt des Nährbodens an Gelatine, indem höherprozentige Gelatine langsamer verflüssigt oder oft durch längere Zeit überhaupt keine Verflüssigung oder nur ein Weicherwerden des Nährbodens erkennen läßt.

9) Gelatinenährboden (mit oder ohne Traubenzuckerzusatze), nach unserer Methode mit Agar überschichtet (s. 1. Mitteilung) und bei 37° C gehalten, zeigen bereits nach 18 bis 24 Stunden eine diffuse, mehr oder weniger üppige Trübung. Bei weiterer Entwicklung verliert diese Trübung ihr gleichmäßiges Aussehen, dafür treten wolkenartige, an Größe zunehmende Flocken auf, welche sich meist schon nach 48-stündiger Entwicklung als üppiger, locker gefügter Bodensatz niedergeschlagen haben. Zucker-Gelatinekulturen, durch 48 Stunden bei 37° C gehalten, bleiben in der Kälte flüssig, werden dazu höherprozentige Gelatinenährboden verwendet, so ist die Peptonisierung eine unvollständige.

10) Bouillon und Zuckerbouillon (1—2 Proz. Traubenzucker).

Sowohl in Kulturen, die unter Wasserstoffatmosphäre zur Entwicklung gelangten, als auch in solchen, welche mit Zuckeragar oder Wasseragar¹⁾ nach der von uns in der 1. Mitteilung angegebenen Gefriermethode überschichtet wurden, zeigte sich meist schon in den ersten 24 Stunden eine mehr oder weniger üppige diffuse Trübung mit gleichzeitiger geringerer oder stärkerer Gasbildung. In Traubenzuckerbouillon war die Gasbildung immer eine stärkere. Nach kürzerer Zeit begannen sich wolkige Flocken zu bilden, die an Größe und Zahl rasch zunahmen und sich langsam zu Boden senkten. Gleichzeitig klärte sich die Bouillon oder Zuckerbouillon mehr und mehr. Nach einiger Zeit erschien der flüssige Nährboden vollkommen klar und am Boden der Eprouvetten hatte sich ein reichlicher, bis 1—2 cm hoher, lockerer, weißlicher Satz angesammelt. Dasselbe Wachstum zeigten auch Massenkulturen in langhalsigen Kolben, an welchen mitunter ein stärkerer, lehmartiger, oft schon unangenehmer Geruch wahrnehmbar war.

11) Peptonwasser (1 Proz. Pepton, $\frac{1}{2}$ Proz. NaCl, schwach alkalisch), zeigte Wachstum in ähnlicher Weise wie die Bouillonkulturen, im allgemeinen nur etwas weniger üppig. Gasbildung war auch hier stets vorhanden, wenn auch nicht immer in reichlicherer Weise.

Zusatz von 2 Proz. Trauben-, Milch- oder Rohrzucker und 2 Proz. Glycerin zum Peptonwasser änderte im Aussehen der Kulturen im großen

1) Wasseragar = Agar (2 Proz.) in gewöhnlichem Wasser ohne jeden Zusatz gelöst.

und ganzen nichts, nur war in den mit Rohrzucker und Glycerin versetzten Peptonwassernährböden das Wachstum weniger üppig. Mit dieser Beobachtung stimmten auch die Resultate der diesbezüglichen Versuche mit Agarnährböden überein.

12) In eiweißfreien Nährböden, die nach den Angaben von Ushinsky bereitet wurden, erhielten wir kein Wachstum.

13) Milch. Die Kulturen in Milch wurden sowohl in Eproutetten unter Wasserstoffatmosphäre oder mit Ueberschichtung (Gefriermethode) als auch in hoher Schicht in großen Kolben (Erlenmeyer-Kolben) zur Entwicklung gebracht. Das Resultat war immer dasselbe: Nach verschieden langer Zeit begann sich unterhalb der obersten (Rahm-) Schicht eine mehr oder weniger breite Zone zu bilden, welche aus trüber, seröser Flüssigkeit bestand. Nach und nach vergrößerte sich diese Zone, während sich gleichzeitig in den unteren Teilen des Kolbens oder der Eproutette ein ziemlich lockeres Gerinnsel ansammelte, welches sich entweder ungleichmäßig von den Wänden des Glasgefäßes zurückzog oder aber ganz gleichmäßig und dann im allgemeinen die Form des betreffenden Glasgefäßes beibehielt, nur in verkleinertem Maßstabe. Die über dem Gerinnsel stehende seröse Schicht zeigte anfangs meist ein gelbgrünlisches Aussehen und blieb eine Zeit lang leicht getrübt und untermengt mit kleineren Flocken. Nach und nach klärte sie sich aber ganz. Gleichzeitig wurden aber auch die unteren Schichten des Gerinnsel etwas fester.

Der Beginn der Veränderungen in der Milch erfolgte in unseren wiederholt ausgeführten Untersuchungen am frühesten nach 5 Tagen, häufiger später: nach 14 Tagen bis 3 Wochen oder noch später. Die Menge des geimpften Materiales hatte in unseren Versuchen keinen Einfluß auf die Schnelligkeit des Eintretens der Gerinnung. Es war gleichgültig, ob wir nur einige Oesen des Kulturmaterialies impften oder aber mehrere Kubikcentimeter.

Niemals sahen wir Verflüssigung des Gerinnsels eintreten, trotzdem wir eine Reihe von Kulturen bis zu 7 Monaten beobachteten.

Die Reaktion der Milchkulturen war immer eine stark saure, der Geruch nicht gleichmäßig intensiv, meist nur schwach säuerlich und nicht gerade unangenehm, in manchen Fällen intensiver und an Butter-säure erinnernd. Nie war der Geruch ein fauliger.

Gasbildung konnten wir in allen unseren zahlreichen Versuchen niemals mit Sicherheit konstatieren.

Im allgemeinen scheint die Milch kein günstiges Nährsubstrat für den Bacillus zu sein; das Wachstum erfolgt langsam und ist ein spärliches.

14) Kulturen auf erstarrtem tierischen Serum (Rinderserum) unter Wasserstoffatmosphäre zeigten ähnliches Wachstum wie Agarplattenkulturen. Nach 8-tägiger Beobachtung (bei 37° C) war keine Verflüssigung nachweisbar.

In Plattenkulturen mit Loefflers Nährboden war die Entwicklung der Kolonien eine üppigere als in reinem Serum. Verflüssigung konnte auch hier nach 8-tägigem Aufenthalte der Kulturen bei 37° C nicht beobachtet werden.

Ueberschichtete Stichkulturen in erstarrter menschlicher Hydrocelenflüssigkeit zeigten schon nach 24-stündigem Wachstum bei 37° C Gasentwicklung, die sich in den nächsten 24 Stunden noch steigerte. Verflüssigung des Serums erfolgte nicht (Beobachtung 8 Wochen).

15) Auf Kartoffeln konnten Oberflächenkulturen bei Züchtung unter Wasserstoffatmosphäre nicht immer erhalten werden (8-tägige Beobachtung). Erfolgte Wachstum, so war es nur durch Abstreifpräparate konstatierbar.

16) Indolbildung konnten wir nicht nachweisen (Zusatz von Kaliumnitrit und Schwefelsäure zu Peptonwasser- und Bouillonkulturen).

17) Schwefelwasserstoffbildung. Stichkulturen in Traubenzuckeragar, dem 1 pro mille Bleizucker zugesetzt war (Morris), ließen wohl Wachstum, nicht aber Schwärzung des Nährbodens erkennen. Ebenso konnten wir auch keine Schwärzung in dem zur Ueberschichtung von Zuckergelatinekulturen verwendeten Traubenzuckeragar mit Zusatz von Bleizucker bemerken, obwohl in der Zuckergelatine üppige Entwicklung (bei 37° C) und lebhaft Gasbildung erfolgt war.

Dagegen konnte in Zuckerbouillonkulturen „in hoher Schicht“, in denen zur Prüfung auf H₂S Bleiacetatpapierstreifen gehalten wurden, intensive Schwärzung der untersten Partien der Streifen schon nach wenigen Tagen beobachtet werden. Die für diese Versuche benutzten langhalsigen Kölbchen hatten Guttaperchaverschluß.

18) Zuckergarschüttelkulturen, die mit 1—3 Tropfen konzentrierter Neutralrotlösung nach Rotberger versetzt waren, zeigten Reduktion des Farbstoffes. Bei Zusatz von 1 Tropfen der Farblösung (zu ca. 20—25 ccm Nährmaterial) erfolgte ziemlich rasche Reduktion bei noch kräftigem Wachstum. Schon bei 2, noch deutlicher aber bei 3 Tropfen Farblösungszusatz erfolgte nur mehr langsame und spärliche Entwicklung des Bacillus und damit verzögerte sich auch das Eintreten der Reduktion.

19) Agar mit Zusatz von $\frac{1}{10}$ Proz. indigoschwefelsaurem Natron ließ schon in den ersten 24 Stunden der Entwicklung vollständige Entfärbung bis ungefähr 1—1 $\frac{1}{2}$ ccm unterhalb der Oberfläche erkennen.

20) Die Gasanalyse von Zuckerbouillonkulturen (6 Tage bei 37° C) im Smithschen Kölbchen, ausgeführt von Prof. v. Zeynek¹⁾, ergab:

„27,68	Proz. Kohlensäure,
71,43	„ Wasserstoff,
0,89	„ Stickstoff.

Sauerstoff und Kohlenwasserstoffe waren nicht vorhanden, der geringe Stickstoffgehalt ist noch innerhalb der Versuchsgrenze.

Die Analyse ist nach Bunsen durchgeführt.“

21) Bei der chemischen Untersuchung einer 22 Tage alten Zuckerbouillonkultur (in langhalsigen Kolben bei 37° gezüchtet) wurde vom Assistenten des Institutes für medizinische Chemie, Dr. Zdarek¹⁾, in der sauer reagierenden Flüssigkeit Milchsäure, Aethylalkohol und spurenweise Buttersäure nachgewiesen; Indol fehlte.

22) Mit sporenhaltigem Kulturmaterial beschickte Zuckergarröhrchen zeigten noch Wachstum, wenn sie 5 Minuten und $\frac{1}{2}$ Stunde lang auf 80° C und 2 Minuten lang auf 100° C erhitzt wurden, hingegen keines mehr, wenn die Erhitzung auf 100° C 10 Minuten lang währte.

1) Herrn Prof. v. Zeynek und Herrn Dr. Zdarek danken wir bestens für die Ausführung dieser Analysen.

(Fortsetzung folgt.)

Nachdruck verboten.

Untersuchungen und Beobachtungen über die Biologie und Pathogenität des *Bacillus prodigiosus*.

[Aus dem hygienischen Institute der kgl. Universität Turin unter Leitung des Herrn Prof. Dr. Pagliani.]

Von Dr. E. Bertarelli, Privatdozent und Assistent.

Ins Deutsche übertragen von Dozent A. Wihlfahrt, Turin.

(Schluß.)

Extraktion durch Austrocknung. Ich trocknete die Kulturpatinen aus, löste sie in 10 Volumen Wasser auf und ließ sie 1 Woche lang bei 0° mazerieren. Daraufhin wurde das Material mechanisch zentrifugiert. Diese Zentrifugation geht wegen der Winzigkeit der Keime und ihrer relativ geringen Dichtigkeit langsam und schwer von statten (nach Rubner ist das spezifische Gewicht des *Prodigiosus* ungefähr 1,40, eine Ziffer, die wahrscheinlich zu hoch gegriffen ist). Nach mehrmals wiederholter Zentrifugation trennt man die beiden Schichten und inokuliert sie ins Peritoneum des Meerschweinchens und subkutan.

Die obere Schicht der zentrifugierten Masse ist ohne jede nennenswerte Kraft; die schwerere Schicht ist beim Meerschweinchen auch nach relativ geringen Dosen ins Peritoneum letal und bewirkt eine transitorische Lokalreaktion, selten nur Suppuration nach subkutaner Einimpfung. Extraktion des Kernproteïden nach der Methode Wooldridge wurde an Kulturpatinen vorgenommen, die in 6—7 Volumen 1-proz. Natriumkarbonat aufgelöst wurden und deren Emulsion bei 4° 3—4 Tage stehen blieb.

Man filtrierte dann die Emulsion mehrmals durch den 3-fachen Filter und fällte den Kernproteïden mit Essigsäure. Allerdings enthält der so erhaltene Kernproteïde auch Kernhistome. Nachstehend werde ich die nach der Methode Beccari ausgeführten Untersuchungen anführen, mit welchen man einen reineren Kernproteïden erlangt:

Der Niederschlag wird in Karbonat aufgelöst, wieder niedergefällt, gewaschen und zuletzt in Natriumkarbonat gelöst. Auch die von Casagrandi empfohlene Mischung leistet gute Dienste, d. i. 1 Teil 0,25-proz. Natriumkarbonat und 4 Teile 0,85-proz. Kochsalzlösung.

Damit werden peritoneale und subkutane Inokulationen an Meerschweinchen vorgenommen. Die Resultate erhellen aus dem Beispiele nachstehender 3 Fälle (p. 313).

In allen Fällen trifft man bei den verendeten Tieren ein reichliches dichtes, kompaktes und eitriges Exsudat an, und zwar im Bauchfell, wenn die Tiere peritoneale Inokulationen erhielten, und subkutan nach subkutaner Injektion.

Extraktion des Kernproteïden nach der Methode von Beccari. Man gibt die Kulturpatinen in 1-proz. Soda (6—7 Volumen), läßt sie in kaltem Raume einige Tage stehen, filtrierte dann mit dem 3-fachen Filter und fällt sie mit Essigsäure. Den Niederschlag behandelt man mit verdünnten Ammoniaklösungen und fällt ihn von neuem. Auf diese Weise gelingt es, einen guten Teil der Kernhistone zu entfernen.

Die mit den Lösungen des so präparierten Kernhistons subkutan oder peritoneal inokulierten Meerschweinchen ergaben einen von dem vorherzitierten wenig unähnlichen Ausgang und Befund:

I. Meerschweinchen.

28. September	Gewicht: 400 g	Inokulation: 1 ccm subkutan
4. Oktober	" 350 "	" 2 " "
8. "	" 300 "	" 2 " "
12. "	" 260 "	das Tier stirbt. " "

II. Meerschweinchen.

28. September	Gewicht: 370 g	Inokulation: 1 ccm ins Peritoneum
4. Oktober	" 320 "	" 2 " " "
8. "	" 270 "	" 2 " " "
9. "	" 260 "	das Tier verendet. " "

III. Meerschweinchen.

28. September	Gewicht: 390 g	Inokulation: 0,8 ccm subkutan
4. Oktober	" 380 "	" 0,5 " " "
8. "	" 350 "	" 1 " " "
10. "	" 350 "	" 1 " " "
14. "	" 300 "	" 2 " " "
17. "	" 275 "	letaler Ausgang. " "

Hämolytische Substanzen. Ich habe bereits auf die hämolytische Kraft der mit der Kerze filtrierten Bouillonkulturen hingewiesen. Die nicht filtrierten besitzen ein noch stärkeres hämolytisches Vermögen. Aber auch hinsichtlich ihrer ist die Hämolyse verschwindend im Vergleich zu den roten Blutkörperchen des Kaninchens, während sie bezüglich des Meerschweinchens ziemlich bedeutend ist. Hämolysin findet sich in den Kulturen erst nach 30—36 Stunden; seine Quantität und die Intensität seiner Wirkung steigt in den Kulturen nach 4- oder 5-tägiger Entwicklung ziemlich stark an, so daß es sich also in dieser Hinsicht wie die anderen toxischen Produkte verhält.

Aus diesen Versuchen an einigen der giftigen Substanzen des Prodigiosus ergibt sich also, daß die Giftigkeit des Keimes speziell an die Bakterienzelle gebunden ist, daß die löslichen Produkte schwach toxisch sind, aber hämolytische Substanzen enthalten, daß das nach der Methode Koch ausgezogene Protein eine toxische Wirkung hat, die der bakterischer Kadaver analog ist, und schließlich, daß der seines Kernhistons beraubte Kernprotein eine mittelmäßige toxische Aktion besitzt. Die Vergiftungsvorgänge des Prodigiosus dürfen also nicht, wie dies mancher Autor wollte, ganz besonders dem Trimethylamin oder anderen Stoffwechselprodukten des Keimes zugeschrieben werden, sondern sie sind innigst mit dem Bakterienkörper verknüpft.

Wie sollen wir uns nun die vielen Versuche anderer Autoren erklären, die abgeschwächte Keime zur Virulenz dem Prodigiosus assoziiert haben, ohne die von dem Prodigiosus bewirkten besonderen Vorgänge wahrzunehmen, wie akute Intoxikation, Gegenwart des Prodigiosus in der Blutbahn? Studiert man nun die Literatur aufmerksam, so fällt es leicht, sich davon zu überzeugen, daß die Forscher, wo sie zu ihren Studien über die mikrobischen Assoziationen den Prodigiosus verwandt haben, entweder sich abgetöteter Kulturen bedienten (die dann in kleinen und immer in unter den Tod erzeugenden

Minimaldosen stehenden Quantitäten inokuliert wurden) oder aber lebender Kulturen in kleinsten Quantitäten. Roger gibt an, in die Blutbahn des Kaninchens lebende *Prodigiosus*-Kulturen geimpft und transitorische Erscheinungen danach beobachtet zu haben — Schläfrigkeit, Anorexie — doch war auch hier die Dosis sicherlich ziemlich klein. Grawitz und de Bary beobachteten nach Inokulation starker Dosen in Hund, Kaninchen und Ratte nur eine lokale Eiterung.

Es ist nicht leicht, zu erklären, warum sie nicht wenigstens bei der Ratte letalen Ausgang zu verzeichnen hatten. Denn es steht zweifellos fest, daß man mit allen zum Versuch herangezogenen Stämmen des *Prodigiosus* (und solche Proben wurden in Turin auf meinen Wunsch von anderen wiederholt) bei der Ratte auch nach subkutanen Injektionen den Tod erzeugte.

In jedem Falle war es mein Wunsch, nicht zum Zwecke einer kritischen Kontrolle, sondern des Interesses wegen, das das Argument nach den vorstehenden Ausführungen bot, die Versuche von Roger, Massa und der anderen Forscher, die den *Prodigiosus* zur Verstärkung anderer Kulturen verwandt haben, neuerdings durchzuführen.

Vor allem habe ich den *B. prodigiosus* dem *B. violaceus* beigemischt, wie dies Massa getan, und dann Kaninchen und Meerschweinchen auf verschiedenen Wegen injiziert.

Der dazu dienende *Prodigiosus* tötete Meerschweinchen von 300 g nach Peritonealinokulation in einer Dosis von 1 ccm. Dagegen war der *B. violaceus* auf allen Einführungswegen wirkungslos, selbst bei Dosen von 4 ccm. Die Mischung der Bouillonkulturen der beiden Keime zu gleichen Teilen tötet das Meerschweinchen noch bei zwischen 1,6—2 ccm schwankenden Dosen. Der Kulturbefund ist konstant, in dem Blute und der Milz findet man nichts anderes als *B. prodigiosus*.

Inokuliert man 2 ccm *B. violaceus* mit wenigen Tropfen *Prodigiosus*, so zeigen sich keinerlei Erscheinungen. Somit also verstärkt der *Prodigiosus* den *Violaceus* nicht nur nicht, wie andere behauptet haben, sondern, wenn wirklich mit der Assoziation der beiden Keime eine Verstärkung eintritt, so betrifft diese — wenn auch in unbedeutendem Grade — den *B. prodigiosus*.

Weiterhin habe ich versucht, den *B. prodigiosus* dem *Meningococcus* Weichselbaums beizugesellen. Solche Mischungen aus kleinen Quantitäten (3—7 Tropfen) *Prodigiosus* und verschiedenen Dosen *Meningococcus*-Bouillonkulturen (von 0,5—3 ccm) wurden in das Bauchfell oder in die Venen von Kaninchen und Meerschweinchen eingeimpft, trotzdem aber gelang es niemals, den *Meningococcus* zu verstärken.

Enthielt dann die Mischung eine größere Quantität von *Prodigiosus*, so starben Meerschweinchen und Kaninchen an *Prodigiosus*-Septikämie, sobald die eingeimpften Quantitäten die *D. m. mortales* des *Prodigiosus* erreichten oder ihnen nahe kamen.

Bei den Assoziationsversuchen mit dem *Streptococcus* und dem *Staphylococcus* — die zuerst durch zahlreiche Inestationen abgeschwächt wurden — erhielt ich folgendes Resultat: Nach Verimpfung von kleinen Dosen erzeugen die beiden Keime keine Septikämie und keine bedeutenden Störungen. Sind die inokulierten Quantitäten reichlich, so gelingt es, das Tier zu töten. Doch ist es schwierig, dieses Resultat zu erzielen.

Führt man dagegen anstatt der Mischung eine hinreichende Quantität von *Prodigiosus* (0,8 ccm beim Meerschweinchen, 1—1,5 ccm beim Kaninchen) ein, so erhält man schnell (12—24 Stunden) den Tod des Tieres. Die entsprechenden Kulturen ergeben dann eine reiche Menge *Prodigiosus* im Kreislauf und weit geringere Quantitäten von *Staphylococcus* und *Streptococcus*.

Nur im Falle, daß der *Streptococcus* schon vorher eine diskrete Virulenz besitzt, ist die Möglichkeit vorhanden, demselben durch Mischung mit dem *Prodigiosus* eine mittlere Verstärkung zu geben. Da tritt dann der Tod wegen Streptoseptikämie ein, wobei dieser Mikroorganismus in der Blutbahn existiert, während der *Prodigiosus* sich nur vereinzelt findet oder ganz fehlt.

Was nun die Vermengung des *Prodigiosus* mit dem Milzbrandbacillus betrifft, so haben meine Untersuchungen zu noch viel interessanteren Ergebnissen geführt. Bekanntlich will Roger gesehen haben, daß man durch Assoziation von *Prodigiosus* und Milzbrandbacillus den Milzbrandbacillus fürs Kaninchen abzuschwächen im stande sei, wogegen dieser Keim beim Meerschweinchen eine Verstärkung erfährt.

Auch Pawlowsky bekräftigt, daß die mit *Prodigiosus* inokulierten Kaninchen den Milzbrand überstehen können, also nicht spezifische Immunitätserscheinungen zeigen, die an die Versuche von Emmerich, Di Mattei, Zagari, Charrin und Guignard und besonders von Klein — auf diesem Felde bezüglich anderer Keime — erinnern.

Lange habe ich mit dem Meerschweinchen experimentiert, und meine dabei erhaltenen Resultate modifizieren die Angaben Rogers nicht unmerklich. Verwandt habe ich dazu einen wenig aktiven Laboratoriumsmilzbrandbacillus, und demselben zu gleichen Teilen 2—3 Tage alte Milzbrand- und *Prodigiosus*-Bouillonkulturen beigemischt.

Anbei die erhaltenen Resultate:

I. Meerschweinchen: Gewicht 320 g. Bauchinokulation mit 1 ccm der Mischung.

Nach 18 Stunden verendet.

Befund: Gegenwart des *Prodigiosus* im Kreislauf, äußerst spärliche Milzbrandkolonien.

II. Meerschweinchen: Gewicht 350 g. Bauchfellinjektion mit 0,5 ccm der Mischung.

Nach 18 Stunden letaler Ausgang.

Befund: Reichliche *Prodigiosus*-Quantitäten im Kreislauf, fast nicht vertreten der Milzbrandbacillus (spärlichste Kolonien nur finden sich auf den Agarplatten mit Milzsaft).

III. Meerschweinchen: Gewicht 250 g. Bauchfellinjektion mit 0,5 ccm Milzbrandbacillen.

Nach 48 Stunden verendet das Tier.

IV. Meerschweinchen: Gewicht 340 g. Bauchfellinjektion mit 0,8 ccm *Prodigiosus*-Bacillen.

Tod nach 14 Stunden.

V. Meerschweinchen: Gewicht 340 g. Subkutane Inokulation mit 1 ccm der Mischung.

Letal nach 20 Stunden.

Befund: *Prodigiosus* in der Blutbahn, diskrete Quantität Milzbrandbacillen.

VI. Meerschweinchen: Gewicht 350 g. Einimpfung einer Mischung

aus Milzbrandbacillen und Prodigiosus (Milzbrandbacillen 1 ccm, Prodigiosus 0,2 ccm).

Nach 48 Stunden tot.

Befund: An Milzbrand verendet.

Und diese Resultate sind konstant.

Fügt man also zu dem stark abgeschwächten Milzbrand den Prodigiosus hinzu, so kann man einen verschiedenartigen Befund erhalten.

War die zusammen mit virulenzlosem Milzbrand injizierte Prodigiosus-Quantität hinreichend, um den Tod des Tieres herbeizuführen, so muß dieses an Prodigiosus-Intoxikation und Septikämie verenden, während alle auf den Milzbrandbacillus sich beziehenden Symptome fehlen müssen, der übrigens des rapiden Aufkommens der Vergiftung wegen keine Zeit gehabt hat, sich zu entwickeln. Fast wäre man sogar dazu verführt, zu glauben, daß der Milzbrandbacillus auch von der in dem Bauchfell befindlichen Serosität verschwunden sei.

Injiziert man dagegen eine Mischung aus Milzbrand und Prodigiosus in der Weise, daß der Prodigiosus nicht in hinreichenden Quantitäten vorhanden ist, um die Vergiftung und nachfolgende Septikämie zu bewirken, dagegen der Milzbrand in bedeutenden Quantitäten, so muß das Tier an Milzbrand zu Grunde gehen und dabei höchstens im Kreislaufe den Prodigiosus mitführen. Wenn aber der Prodigiosus im Mischungsverhältnis sehr schwach vertreten war, so muß ein exklusiver Befund von Milzbrandbacillen resultieren.

Was man aber nicht zu demonstrieren vermag, oder was mir zum mindesten bis heute nicht gelungen, ist die wirkliche und erfolgreiche Virulenzsteigerung des abgeschwächten Milzbrandbacillus. Im Gegenteil, durch die vorgenommenen Versuche bin ich eher dazu verleitet, eine Abschwächung der von der Milzbrand-Prodigiosus-Mischung gegebenen Effekte anzunehmen.

Ueberdies habe ich dann eine Reihe Versuche mit einem wirksamen Milzbrandbacillus aus dem Laboratorium des Prof. Sclavo angestellt.

Der in Rede stehende Milzbrandbacillus tötete die Kontrolltiere in 36 Stunden mit einem ganz typischen Befund nach subkutanen Inokulationen von 0,1 ccm. Einige Meerschweinchen erhielten Injektionen von einfachen Prodigiosus- oder Milzbrandkulturen, andere eine Mischung zu gleichen Teilen aus Milzbrand und Prodigiosus, die erst im Augenblick des Innests selbst vorgenommen wurde. Nachstehend einige der Ergebnisse:

I. Meerschweinchen: Gewicht 400 g. Subkutane Inokulation mit 0,1 ccm Prodigiosus.

Ueberlebt und zeigt keine Störungen.

II. Meerschweinchen: Gewicht 280 g. Subkutane Inokulation mit 0,2 ccm Prodigiosus.

Ueberlebt ohne jederlei Störungen.

III. Meerschweinchen: Gewicht 390 g. Subkutane Inokulation mit 0,1 ccm Milzbrandbacillen.

Verendet in 36 Stunden.

IV. Meerschweinchen: Gewicht 360 g. Subkutane Inokulation mit 0,2 ccm Milzbrandbacillen.

Verendet in 36 Stunden.

V. Meerschweinchen: Gewicht 360 g. Subkutane Inokulation mit 0,1 ccm Milzbrandbacillen.

Verendet in 36 Stunden.

VI. Meerschweinchen: Subkutane Inokulation mit 0,2 ccm der Mischung aus Milzbrandbacillus und Prodigiosus.

Verendet nach 50 Stunden.

Befund: Milzbrandseptikämie. Ueberdies beobachtet man spärliches gelatinöses Oedem.

VII. Meerschweinchen: Subkutane Inokulation mit 0,2 ccm derselben Mischung.

Verendet nach 48 Stunden.

VIII. Meerschweinchen: Subkutane Inokulation mit 0,4 ccm vorstehender Mischung.

Verendet nach 48 Stunden.

IX. Meerschweinchen: Subkutane Inokulation mit 0,4 ccm vorstehender Mischung.

Verendet nach 36 Stunden. Spärliches Oedem.

X. Meerschweinchen: Subkutane Inokulation mit 0,6 ccm vorstehender Mischung.

Verendet innerhalb 48 Stunden.

Die anderen Proben gaben analoge Resultate, d. h. abgesehen von seltenen Fällen, beobachtete man, daß die mit Milzbrandbacillen und Prodigiosus inokulierten Tiere nach jenen mit gleichen Dosen reinen Milzbrandes injizierten starben. Auf jeden Fall haben wir stets einen konstant auf Milzbrandseptikämie lautenden Befund, wobei wir in Milz und Blut nichts anderes als Milzbrand vorfinden.

Das Ergebnis ähnelt also dem von Roger beim Kaninchen erhaltenen, während es in vollem Widerspruche steht mit dem, welches dieser Autor beim Meerschweinchen erhalten haben will. Damit ist nun bewiesen, was auch andere Autoren schon hervorgehoben haben (Pawlowsky), daß zwischen Milzbrandbacillus und Prodigiosus ein gewisser Antagonismus bestehen muß. Der exklusive Milzbrandbefund würde nun allerdings dartun, daß der Prodigiosus entweder in die Phagocyten inglobiert oder allgemein zerstört ist; doch ergibt sich uns, daß die Gegenwart dieses Mikroorganismus das Entstehen der Milzbrandmanifestationen zweifellos verzögert.

Daß aber der erwähnte Antagonismus wirklich existiert, kann man viel leichter in vitro nachweisen. Sät man nämlich in eine Röhre Bouillon gleichzeitig je eine Oese Prodigiosus und Milzbrand, so hat man nach 24 Stunden nur noch eine reine Prodigiosus-Kultur, oder aber die Milzbrandbacillen sind äußerst spärlich. Sät man dann analoger Weise den Milzbrand in eine 24 Stunden alte Prodigiosus-Bouillonkultur, so ist die Entwicklung des Milzbrandes gleich null; während man dagegen beobachten wird, daß sich in der Kultur fast nur noch Prodigiosus findet und der Milzbrand auf wenige Exemplare reduziert ist, sobald man den Prodigiosus in eine kräftige Milzbrand-Bouillonkultur einsetzt. Es kommt sogar zuweilen vor, daß man in den mikroskopischen Präparaten nur äußerst spärliche Milzbrandfasern antrifft, während die Agarplatten nur noch Prodigiosus-Kolonieen aufweisen.

Es übt sonach der *B. prodigiosus* eine aktive antagonistische Wirkung auf den Milzbrand aus, der in Gegenwart des ersteren in kurzer Zeit aufgequellt und aufgelöst wird.

Die bakterientötende Einwirkung wird hauptsächlich von dem Bacillenkörper bedingt, während die mit der Kerze filtrierten Prodigiosus-Bouillonkulturen eine bakterientötende Wirkung in weit ge-

ringerem Maße besitzen. Nur die sehr alten Kulturfiltrate sind ein für die Milzbrandkultivierung verhängnisvolles Terrain¹⁾.

Dieser *in vitro* klar zu Tage tretende und, soweit mir bekannt, bis heute noch nicht demonstrierte Antagonismus des *Prodigosus*, sowie die im Tiere vom *Prodigosus* gegen Milzbrand bewirkten, wenn auch nur mittelmäßigen Abschwächungserscheinungen, führten logischerweise zu dem Versuche, mit dem *Prodigosus* oder seinen Produkten gegen Milzbrand in derselben Weise zu immunisieren, wie man es versucht hat, mit einigen Produkten des *B. pyocyaneus* — *Pyocyanisis* — die Tiere gegen Milzbrand zu immunisieren (mit nicht spezifischer Immunität).

Zweifellos konnte dieser Versuch keinen, auch nicht den entferntesten Anspruch auf Praktikizität machen, von dem Augenblick an, da wir in den Seris und besonders in dem von *Sclavo* spezifische und sichere Immunisationsmittel besitzen.

Nur vom Gesichtspunkte des experimentellen Interesses aus habe ich in dieser Hinsicht einige Versuche angestellt. Weitere ausführlichere Versuche sind im Gange. Ich behalte mir vor, später noch auf diesen Punkt zurückzukommen.

Vor allem habe ich versucht, die Versuchstiere, vornehmlich das Meerschweinchen, gegen die *Prodigosus*-Vergiftung zu immunisieren, besonders um zu konstatieren, ob das gegen *Prodigosus* immunisierte Tier der Milzbrandinfektion gegenüber ein besonderes Verhalten zeigte, dann um zu verifizieren, ob das Serum dieser Tiere im Leben und *in vitro* eine besondere Einwirkung auf den Milzbrandeuzerger habe, und schließlich in der Hoffnung, daß man — wenn das Tier erst gegen *Prodigosus* immunisiert ist — demselben bei sich entwickelnder oder schon eingetretener Milzbrandinfektion eine bedeutende Quantität *Prodigosus* (oder seine Produkte) einimpfen könnte, eben um zu beobachten, ob in diesem Falle die Konkomitanz des *Prodigosus* wirklich Erscheinungen zu Tage förderte, die mit den von mir *in vitro* beobachteten gleichartig wären.

Die in dieser Richtung unternommenen Versuche sind jedoch auch vom Gesichtspunkte des experimentellen Interesses nicht sehr ermutigend.

Sehr schwierig ist es vor allem, die Tiere vollständig gegen *Prodigosus* zu immunisieren.

Zu diesem Zwecke habe ich verschiedene Wege betreten:

- 1) Steigende Inokulationen ins Peritoneum mit 10—12 Tage alten, mit der Kerze filtrierten Bouillonkulturen.
- 2) Subkutane und peritoneale Inokulationen mit durch Hitze (80° während wenigstens 1 Stunde) getöteten Bouillonkulturen.
- 3) Inokulation von durch Hitze getöteten und in Wasser emulsierten Agarplattenkulturen.
- 4) Inokulation des Kernproteidins.
- 5) Inokulation gradweise steigender Dosen lebender Bouillonkulturen.

Die Inokulation filtrierter Bouillonkulturen und des Kernproteidins führte zu gar keinem Resultate.

1) Es ist bekannt, daß ähnliche Erscheinungen *in vitro* von *Emmerich*, *Bouchard*, *Woodhead* und *Wood* und *Blagovetschevski* nach Vermengung des *Pyocyaneus* mit dem Milzbrandbacillus; von *Emmerich* und *di Mattei* nach Assoziation des *Streptococcus* und des Milzbrandbacillus und von *Czaplewski*, *Baumgarten* und anderen nach Assoziation des Milzbrandbacillus mit *Pneumobacillus* und *Staphylococcus* beobachtet worden sind.

Die Inokulation getöteter (Agarpatinen- und Bouillonkulturen) und lebender Kulturen brachten ein unsicheres Ergebnis, denn mit 30 injizierten Tieren konnte ich nur bei 4 zu definitiven Resultaten gelangen.

Nachstehend einige Angaben aus dem Protokoll bezüglich 4 Meerschweinchen mit positivem Resultat und 4 anderer Tiere. Des mangels des Interesses wegen unterlasse ich es, an dieser Stelle den ganzen Protokolltext wiederzugeben.

Meerschweinchen a) Gewicht 330 g. Endoperitoneale Inokulation. 1. September 0,2 ccm durch Hitze getöteter Bouillonkulturen. (Die Bouillonkultur ist bei 1,2 ccm absterbend.)

Gewicht	320 g.	Endoperitoneale Inokulation:	6. Sept.	0,2 ccm in	Hitze getöteter	Bouillonkultur
"	312	"	"	10.	"	0,3 " " " "
"	318	"	"	14.	"	0,5 " " " "
"	320	"	"	17.	"	0,5 " " " "
"	320	"	"	21.	"	0,8 " " " "
"	312	"	"	23.	"	0,8 " " " "
"	310	"	"	26.	"	1 " " " "
"	310	"	"	30.	"	1 " " " "
"	300	"	"	3. Okt.	"	1,4 " " " "
"	300	"	"	5.	"	1,5 " " " "

Am 7. Oktober wird dem Meerschweinchen in das Bauchfell 1 ccm lebender Kultur eingepflegt, die bei der Kontrolle nach Dosen von 0,8 ccm tödlich wirkte. Das Tier resistent, stirbt dann am 15. Oktober an Marasmus, mit negativem Resultat bez. des Prodigiosus.

Meerschweinchen b. Gewicht 420 g. Endoperitoneale Inokulation vom 1. September bis 15. Oktober mit allmählich ansteigenden Dosen von 0,2—2 ccm derselben abgetöteten Bouillonkultur. Am 18. Oktober werden weitere 2 ccm abgetöteter Bouillonkultur eingepflegt. Das Meerschweinchen stirbt am 20. mit spärlichen Vergiftungssymptomen.

Meerschweinchen c. Gewicht 400 g. Erhält subkutan während des ganzen Septembers kleine Dosen abgetöteter Bouillonkulturen. Am 4. Oktober wird eine toxische Dosis — minimal mortale — abgetöteter Bouillonkulturen in das Bauchfell eingepflegt. Das Tier stirbt in 8 Stunden an akuter Vergiftung.

Meerschweinchen d. Gewicht 370 g. Alle 3 Tage Inokulation lebender Bouillonkultur in Dosen von 0,2—0,3—0,5 ccm. Das Tier magert ab, aber nach einer Pause von einem Monat und einer Woche erträgt es 1,5 ccm lebender Kultur, die bei 0,8 ccm tödlich ist. Doch dauert das Abmagern an.

Meerschweinchen e. Gewicht 400 g. Inokulation getöteter Kultur in kleinen Quantitäten (0,2—0,3—0,4 ccm). Nach zweimonatlicher Behandlung stirbt es nach einer Injektion von 1 ccm lebender Kultur.

Meerschweinchen f. Gewicht 450 g. Erhält länger als einen Monat allmählich ansteigende Dosen zuerst toter und dann lebender Kultur. Nach 40 Tagen erträgt das Tier mit Leichtigkeit auch 1,5 ccm lebender Kultur.

Meerschweinchen g. Gewicht 350 g. Endoperitoneale Injektion kleiner Dosen lebender Kultur. Stirbt nach einem Monat an Prodigiosus-Septikämie nach Inokulation von 0,8 ccm lebender Kultur.

Meerschweinchen h. Gewicht 350 g. Inokulation getöteter Kultur in kleinen Dosen. Stirbt an Marasmus nach 20 Tagen (5 Injektionen von 0,3—0,5 ccm).

Weitere Angaben lasse ich beiseite. Wie also hieraus ersichtlich, ist es keine leichte Sache, die Immunität gegen Prodigiosus zu ver-

leihen, und so habe ich denn darauf verzichten müssen, schon jetzt das Verhalten des Milzbrandbacillus in diesen Tieren zu studieren. Nur mit Meerschweinchen f konnte ich einen Versuch anstellen, dem aber natürlich wenig Wert beizumessen ist, da weitere Kontrollen fehlen. Dasselbe erhielt 0,3 ccm aktiver Milzbrandbouillonkultur in Dosen von 0,1 ccm aktiver Kultur und überlebte das Kontrolltier, dessen Inokulation sich auf 0,1 ccm belief, um 30 Stunden. Doch kann dieser Vorgang auch nur ganz zufällig sein; ich führe ihn also hier an des geringen Interesses wegen, das er beanspruchen kann.

Etwas positivere Resultate ergaben sich nach Inokulation von Milzbrandbacillus zusammen mit *Prodigiosus* oder von Milzbrandbacillus mit einigen Produkten des *Prodigiosus*. In mancher Hinsicht hat es nach einigen ersten Versuchen den Anschein gewonnen, daß bezüglich der *Prodigiosus*-Produkte in gewissem Sinne dieselben Erscheinungen auftreten, wie wir solche bezüglich des *Pyocyaneus* festgestellt haben.

Doch ist eben das gesammelte Beweismaterial noch so spärlich, daß ich es mir ersparen zu müssen glaube, hier weiter davon zu sprechen, um so mehr, als die unentbehrlichen auf sie bezüglichen Kontrollen noch fehlen. Trotzdem habe ich sie vorgeführt, schon deswegen, weil schon vor einiger Zeit ein anderer Autor von einer (nicht spezifischen und augenblicklich noch stark problematischen) Immunisation gegen Milzbrandbacillus mittels *Prodigiosus* gesprochen hat, und weil schon vor einigen Jahren Klein mitgeteilt hat, mittels des *Prodigiosus* (und dann auch mit einigen anderen Keimen) Tiere gegen Choleravergiftung immunisiert zu haben.

In späteren Untersuchungen wird es mein Bemühen sein, nachzuforschen, ob es möglich ist, mit einem anderen, weniger marantischen *Prodigiosus*-Produkt als dem Protein eine experimentelle Immunität gegen einige pathogene Formen zu erreichen.

Für den Augenblick aber bleibt es erwiesen, daß man bei Assoziation abgeschwächter pathogener Keime mit *Prodigiosus* mit äußerster Vorsicht nur von einer durch den *Prodigiosus* bewirkten Verstärkung reden darf, da in einigen Fällen jede Verstärkung fehlt oder problematisch ist, während man dagegen, wie das beim Milzbrandbacillus der Fall ist, eine Verminderung der Infektionseffekte auch bei bezüglich der Empfänglichkeit typischen Tieren, wie bei den Meerschweinchen, beobachten kann. Außerdem ergibt sich aus den vorstehenden Darlegungen, daß der Antagonismus zwischen *Prodigiosus* und Milzbrand *in vitro* äußerst hochgradig ist.

Mit diesen Beobachtungen glaube ich nun nicht, die hauptsächlichsten Angaben vieler Forscher über die Biologie des *Prodigiosus* und über die Bedeutung der mikrotischen Assoziationen modifiziert zu haben, um so mehr, als der größte Teil der zitierten Experimente (Roger, Klein etc.) unter ganz besonderen Verhältnissen gemacht worden ist. Von meinen Studien ist für die Biologie von einigem Interesse vor allem der Gedanke, daß der *Prodigiosus*, ohne ein pathogener Keim zu sein, ganz bedeutende toxische Substanzen besitzt und elaboriert, daß er, einmal in diskreten, nicht sehr starken Quantitäten in den Organismus eingeführt, eine wirkliche Septikämie erzeugen kann. Es müssen demnach die allgemein hierüber in den Lehrbüchern gegebenen Ansichten umgeändert werden in dem Sinne, daß der Keim vom Gesichtspunkte möglicher Infektionen aus zwar als unschädlich zu erachten ist,

aber als ziemlich toxisch — auch ohne zu sehr hohen Dosen zu greifen, wie einige Autoren glauben. —

Von diesem Standpunkte, wenn auch nur entfernt, vermuten zu wollen, daß der *Prodigiosus* für den Menschen eine pathogene Bedeutung haben könne, wäre augenblicklich zu weit gegriffen. Denn die Geschichte des sozusagen epidemischen Auftretens des *Prodigiosus* hat niemals ein Opfer verzeichnet, was doch angesichts der Tatsache, daß derselbe eine enorme Verbreitung aufweist (es sei hier daran erinnert, daß der *Prodigiosus* von Houston häufig im Boden angetroffen wurde, von Russell und Karnauth in den Pflanzen, wo er sich weiter entwickeln konnte, von Bordoni und zahlreichen anderen Beobachtern im Fleische, von Car in den Eingeweiden der Insekten, und von Kelly in einem Falle von Appendicitis) und angesichts der Leichtigkeit, mit der er zu uns gelangt, jeden Zweifel zu heben imstande sein mußte. Uebrigens habe auch ich selbst bei der Präparation der Proteine nach der Methode von Koch kleine Quantitäten lebender Bacillen eingeatmet und zuweilen, auch ohne es zu bemerken, verschluckt, ohne jemals irgend welche Einwirkung zu verspüren. Bei den Tieren hat mir dann weder die Einführung selbst bedeutender Kultur Dosen noch die Applikationen geringer Quantitäten Kulturpatina bei fortwährenden Läsionen jemals nennenswerte Symptome geliefert.

Nur bezüglich der Insekten war in mir der Zweifel aufgestiegen, ob nicht der *Prodigiosus* zuweilen einen schädlichen Einfluß ausüben könne, und dies gerade, weil er zuweilen in der Seidenraupe aufgefunden wurde und die Chrysalide der Seidenraupe sich nicht zu selten fuchsinrotähnlich zeigte, eine Farbe, die gerade an den *Prodigiosus* erinnert. Aber die von mir bis heute untersuchten Seidenraupen — ihrer Zahl nach gering infolge der ungünstigen Jahreszeit, in der ich meine Nachsuchungen begann — haben mir keine positiven Ergebnisse geliefert.

Ist nun aber der *Prodigiosus* unter den gewöhnlichen Umständen auch unschädlich, so sind doch seine biologischen Eigenschaften, seine Vergiftungsfähigkeit, sein besonderes Verhalten anderen Keimen gegenüber, die Pigmentation, die er beim Durchgang durch andere Tiere erwirbt, immerhin interessante Tatsachen, die nach meiner Ansicht wohl verdienten, in Erwägung gezogen zu werden.

Bibliographie.

- Ehrenberg, Monatsber. über die zur Bekanntm. geeign. Verhdl. d. kgl. preuß. Akad. d. Wissensch. Berlin. Bd. XLVIII—LI.
 Cohn, F., Jahresber. d. schles. Ges. f. vaterl. Kultur. 1850.
 — —, Beitr. z. Biologie d. Pflanzen. Bd. I.
 Schröter, Beitr. z. Biologie d. Pflanzen. Bd. I.
 Scheurlen, Arch. f. Hygiene. Bd. XXVI. 1896.
 Rubner, Arch. f. Hygiene. Bd. IX.
 Schottelius, M., Festschr. f. Albert v. Kölliker. 1887. Ausz. Ann. Pasteur. 1887.
 Kuntze, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIV.
 Kübler, P., Centralbl. f. Bakt. Bd. V.
 Grawitz u. de Bary, Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. CVIII. 1887.
 Rosenberg, W., Inaug.-Dissert. Würzburg 1899.
 Kraft, E., Inaug.-Dissert. Würzburg 1902.
 Spica, P., Atti del R. Ist. Veneto di scienze, lettere e darti. Ser. VIII. Vol. II. 1899/1901.
 Wasserzug, E., Ann. Pasteur. 1888.
 Gessard, C., Ann. Pasteur. 1902.
 Eisenberg, J., Bakteriolog. Diagnostik. 1891.
 Flügge, Die Mikroorganismen. 1896.

- Gorini, Rivista d'igiene e di san. pubbl. 1893.
Schneider, P., Arb. a. d. bakt. Inst. d. techn. Hochschule Karlsruhe. Bd. I. 1895.
Rodet, La variabilité des microbes. Paris 1895.
Friedrich, P. L., Arch. f. klin. Chir. Bd. LXXX. 1895.
Galeotti, C., Lo sperimentale. Ann. XLVI. Fasc. 3.
Wróblewski, V., Centralbl. f. Bakt. Bd. XXII. 1896.
Steinhaus, J., Die Aetiologie der akuten Eiterungen. 1889.
Bordoni-Uffreduzzi, Hyg. Rundschau. 1894.
Fermi, C., Centralbl. f. Bakt. Bd. VII. 1890.
Stagnitta-Balistrieri, Arch. f. Hygiene. Vol. XIV.
Marx, H., Arch. f. klin. Chir. Bd. LXII.
Russell, H. L., Dissertation of the Johns Hopkins Univ. Baltimore 1892.
Kornauth, K., Centralbl. f. Bakt. Bd. XIX. 1896.
Houston, A. C., Centralbl. f. Bakt. Bd. XXV. 1899.
Wolfenden, R. N. u. Ross, F. W., The Lancet. 1898.
Schlüter, G., Centralbl. f. Bakt. Bd. XI. 1892.
Klein, E., Centralbl. f. Bakt. Bd. XI. 1892.
Müller, F., Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVI.
Cao, U., Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVI.
Klein, E., Centralbl. f. Bakt. Bd. XXV. 1899.
Konwalewski, Russ. Arch. f. Pathol. Bd. V. 1892.
Kelly, A. O. J., Philadelphia med. Journ. Vol. IV. 1899.
Fischer, A., Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXV. 1900.
Flütterer, Berl. klin. Wochenschr. 1898.
Marx, H. u. Woithe, F., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900.
Pasquini, P., Ann. d'igiene speriment. 1902.
Roger, G. H., Bull. d. l. soc. d. biologie. 1889.
— —, Compt. rend. d. l'acad. d. sciences. 1889.
— —, Bull. d. l. soc. d. biologie. 1891.
— —, Ibid. 1895.
— —, Ibid. 1889.
Massa, C., Rassegna scienze mediche. 1889.
Vaillard u. Vincent, Ann. Pasteur. 1891/1893.
Besson, Ann. Pasteur. 1885.
Nocard, Société de biologie. 1889.
Nakaninski, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXX.
Monti, A., Rend. dell'acad. Lincei. II. Semester. 1889.
— —, Boll. soc. med. di Pavia. 1889.
— —, Ibid. 1890.
Coley, W. B., Americ. Journ. of med. sciences. 1894.
Klein, E., Centralbl. f. Bakt. Bd. XIII. 1893.
Huiskamp, Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1901.
Beccari, Lo sperimentale. 1902.
Miquel et Cambier, Traité de bactériologie. Paris 1902.
Abba, F., Man. tecn. di microscopia e batteriol. Turin 1902.
Fraenkel, C., Manuale di batteriol. Turin 1902.
Günther, C., Einführung in das Studium der Bakteriologie. 1898.
Lehmann u. Neumann, Atlante e principii di batteriologia. Mailand.
Migula, System der Bakterien.

Nachdruck verboten.

Ueber die aktiven Substanzen des B. coli.

[Aus d. hygienischen Institut d. Kgl. Universität Neapel. Direktor:
Prof. V. de Giaxa.]

Von Dr. **Alessandro Carega.**

Von den Arbeiten von Paladino Blandini über die aktiven Substanzen des B. typhi ausgehend, habe ich dieselben Untersuchungen auf das B. Coli ausgedehnt.

Das B. Coli wurde direkt aus dem Stuhle gezüchtet und nach Bestimmung seiner Virulenz in einen Liter Bouillon geimpft und 12 Tage bei 37° C im Brutschrank gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit ließ ich die Bouillon auf dem Wasserbade bei 45° C bis auf 100 ccm abdampfen und fügte zur Trennung der Eiweißstoffe 300 ccm absoluten Alkohols hinzu. Der Niederschlag wurde auf dem Filter gesammelt und nach Abdampfen des Alkohols 24 Stunden lang mit 50 ccm 0,5-proz. Natronlauge in Berührung gebracht. Hierauf wurde wieder filtriert, die ungelösten Bestandteile wurden abgewaschen und bei 40° C getrocknet. Die klare durchfiltrierte Flüssigkeit wurde schwach mit Essigsäure angesäuert und der sich bildende Niederschlag auf dem Filter mit angesäuertem Wasser abgewaschen und bei 40° C. getrocknet. Die zuerst gewonnene Substanz zeigte die Reaktionen des Nukleins, die zweite die des Nukleoalbumins. Die von der Kultur erhaltene Menge des Nukleins blieb ziemlich konstant, da beinahe 20 cg auf einen Liter Nährbouillon kamen. Anders war es mit dem Nukleoalbumin, welches zwischen 5 und 20 cg pro Liter der Kultur wechselte.

Die biologische Wirkung beider Substanzen war sehr verschieden. Das fein gepulverte Nuklein rief, in sterilem Wasser aufgeschwemmt und drei Tage bei 60° C sterilisiert, bei den Kaninchen, wenn es subkutan einverleibt wurde, die Bildung eines Knötchens hervor, das nach etwa 5 Tagen aufbrach, einen weißlichen Brei entleerte, der mikroskopisch aus nekrotischen Fetzen bestand, aber kulturell sich steril erwies. Das Nukleoalbumin verursachte in schwacher, 0,25-proz. Kohlensäurenatronlauge gelöst, bei 60° C sterilisiert, subkutan Kaninchen eingespritzt, eine begrenzte Infiltration, die aus Anhäufungen von polynuklearen Leukocyten bestand und nach etwa 5 Tagen verschwand. Die subkutanen Einspritzungen beider Substanzen wurden von den Kaninchen gut vertragen, da die durch sie verursachte Temperaturerhöhung und Gewichtsabnahme gering und vorübergehend war. Anders war es mit den intravenösen Einspritzungen. Als ich einem Kaninchen etwas Nuklein in die Ohrvene einspritzte, blieb das Tier 2—10 Minuten wie niedergeschlagen, mit heftiger Atemnot, dann machte es unkoordinierte Bewegungen, fiel zu Boden und starb nach kurzer Zeit unter klonischen Krämpfen. Gleich nach dem Tode trat eine intensive Leichenstarre ein. Bei der Autopsie fand sich starke Blutstauung in den subdiaphragmatischen Organen; die Lungen waren blutarm, der linke Ventrikel war leer und zusammengezogen, der rechte erweitert und mit einem großen Blutgerinnsel ausgefüllt, das sich bis in die V. cavae ausbreitete. Die geringste nötige Menge Nuklein, um diese Wirkung hervorzubringen, war 2 cg pro kg

1) Paladino-Blandini, Riforma medica. 1901.

Tier, und diese Menge war konstant bei den verschiedenen Stämmen und Graden der Virulenz des *B. Coli*. Der Tod des Kaninchens erfolgte ersichtlich durch Gerinnung des Blutes in den Gefäßen, und letztere hängt nach Paladino von der Tatsache ab, daß das Nuklein eine rasche Phagolysis verursacht, wodurch eine bedeutende Menge Plasma befreit wird.

Auch das in die Venen eingespritzte Nukleoalbumin tötete die Kaninchen in wenigen Minuten, allein der Tod fand ohne Krämpfe statt. Die Autopsie ergab leichte Blutstauung in allen Organen; im Herzen wenig schwärzliches, flüssiges Blut. Die geringste Menge Nukleoalbumin, welches im stande ist, ein Kaninchen in wenigen Minuten zu töten, schwankt zwischen 6—15 cg pro kg Tier, je nach der Virulenz und dem Stamm der Bacillen.

Das Nuklein behielt ganz seinen toxischen Wert auch nach der Erhitzung bis 100° C während 15 Minuten. Nicht so das Nukleoalbumin, welches ganz indifferent wurde; jedoch darauf werde ich später zurückkommen.

Tiere, welche mit wiederholten Veneneinspritzungen von Nuklein in kleinen Mengen (0,25—1 cg) vorbehandelt wurden, zeigten merkliche Temperaturerhöhung, starke Abmagerung und starben in wenigen Tagen, ohne daß es je gelang, die ganze Dosis von 2 cg pro kg. Gewicht zu überschreiten. Das Nuklein hatte also eine kumulative Wirkung. Bei der Autopsie zeigten die Kaninchen zwar bedeutende, aber keine spezifische Veränderungen in den Nieren, in der Leber und dem Darne. Die Veränderungen bestanden: In den Nieren aus mehr oder weniger bedeutender Stauung, kleiner punktförmiger Koagulationsnekrose in einigen gewundenen Nierenkanälchen, trüber Schwellung des Epithels und an einigen Stellen Ablösung desselben. In der Leber: Stauung, trübe Schwellung, Koagulationsnekrose. Im Darne: Diskrete Stauung, leichte Schwellung der Peyer'schen Plaques.

Das Blutserum der mit Nuklein vorbehandelten Kaninchen zeigte nie agglutinierende Eigenschaften auf die Kulturen des *B. coli*.

Ganz anders verhielt sich das Nukleoalbumin. Ich behandelte damit einige Kaninchen vor, indem ich ihnen in die Ohrvene 5 cg der Substanz in 0,25-proz. NaCO₃-Lösung aufgelöst alle 4 Tage einspritzte. In den 24 Stunden, die der ersten Einspritzung folgten, zeigte das Kaninchen leichte Temperaturerhöhung, ungefähr 1° C, und eine kleine Gewichtsabnahme von 30—70 g. Gegen den 4. Tag wurde die Temperatur wieder ganz normal und das Gewicht stieg wieder zu seinem ursprünglichen. Ich entnahm das Blut und untersuchte das spezifisch agglutinierende Vermögen des Serums. Es war sehr schwach: 1:50. Das Blutserum, das am 4. Tage nach der 2. Injektion entnommen wurde, hatte ein agglutinierendes Vermögen von 1:100, das sich nach der 3. Injektion bis 1:800 steigerte. Eine Prüfung der Agglutination nach der 4. Einspritzung ergab zu meiner großen Ueberraschung einen Wert von 1:100, und nach der 5. Injektion verschwand die Agglutination, oder, besser gesagt, sie war nicht mehr spezifisch, indem sie einen Wert von 1:30 hatte, wie sie im Blutserum normaler Kaninchen vorkommt. Ich wiederholte die Versuche mehrmals, sowohl mit den gleichen als auch mit kleineren Dosen Nukleoalbumins, aber die Resultate waren immer gleich. Die Kaninchen vertrugen die Injektionen ausgezeichnet; dieselben schädeten ihnen gar nichts; die Agglutination stieg bis zur 3. Injektion, ging bei der 4. herunter, und bei der fünften verschwand sie vollständig. Ich

versuchte alsdann, das Nukleoalbumin zu injizieren, nachdem ich dasselbe aufgelöst 15 Minuten bis auf 100° C erhitzte. Das Resultat war das gleiche; nur zeigten in diesem Falle die Kaninchen keine Störungen. Ich spritzte ihnen auf einmal 15 cg ein und nach 4, 8, 12 Tagen untersuchte ich die Agglutination, sie war nur 1:50.

Daraus schloß ich, daß, wenn das Nukleoalbumin dem Blutserum agglutinierende Eigenschaften verleihen soll, es in kleinen Dosen injiziert werden muß, und aus meinen Versuchen ist zu ersehen, daß erst nach der 3. Injektion das Maximum erreicht wird.

Die injizierte Menge war bei jeder Injektion bis zu bestimmten Grenzen durchaus indifferent, da ich das Maximum der Agglutination von 1:800 sowohl nach 3 Injektionen von 5 cg als nach 3 Injektionen von 0,25 cg erreichte.

Die Wirkung des Nukleoalbumins ist doppelt toxisch und agglutinierend. Die Tatsache, daß das Nukleoalbumin, der Wärme ausgesetzt, das toxische Vermögen verliert, während es dagegen das agglutinierende behält, kann beweisen, daß es, wie beim Typhus, aus 2 Gruppen verschiedener Substanzen besteht, aus einer durch Wärme zerstörbaren Gruppe und aus einer durch Wärme nicht zerstörbaren Agglutinationsgruppe. Also muß das Nukleoalbumin unter jedem Gesichtspunkte als ein Toxin angesehen werden.

Auf die Erzeugung der Agglutination hat die erste, die Toxophorengruppe, gar keinen Einfluß, was dadurch bewiesen wird, daß die Agglutination bei einem beständigen Maximum bleibt, sowohl bei vollständig reinem Nukleoalbumin als auch bei dem durch die Hitze von der Toxophorengruppe befreiten. Es bleibt also nur die Agglutinationsgruppe übrig, für welche man die Hypothese aufstellen kann, daß sie sich wie die Haptophorengruppe von Ehrlich verhält, indem sie, mit dem Nukleoalbumin in den Tierkörper eingeführt, Gelegenheit zur Bildung und Ablösung spezieller Seitenketten bietet, die auf diese Weise frei im Blute, resp. im Blutserum zirkulieren und dem letzteren spezifische Eigenschaften verleihen.

Ich habe auch einige Immunisierungsversuche gemacht. Zu diesem Zwecke habe ich 5 Kaninchen der Behandlung mit Nukleoalbumin unterworfen. Vieren davon spritzte ich alle 4 Tage 5 cg Nukleoalbumin ein; es wurden im ganzen 4 Injektionen vorgenommen. Einem anderen gab ich auf einmal 20 cg Nukleoalbumin, dessen toxophore Gruppe durch die Hitze zerstört worden war. Ich prüfte während der Behandlung das agglutinierende Vermögen des Blutserums, und dies ergab nur Resultate, die den vorangehenden gleich waren. 15 Tage nach der letzten Injektion spritzte ich den 5 Tieren und einem Kontrollkaninchen die doppelte tödliche Dosis des B. coli ein. Alle 5 vorbehandelten Kaninchen starben in weniger als 15 Stunden, das Kontrolltier dagegen lebte ungefähr 80 Stunden. Die Autopsie bestätigte, daß der Tod durch Infektion mit B. coli stattgefunden hatte. Augenscheinlich zeigte das Nukleoalbumin in meinen Versuchen keine immunisierende Kraft; es schien sogar einen Einfluß auf die Kaninchen auszuüben, indem es sie der Infektion gegenüber empfänglicher machte. Das wäre vielleicht, nach Behring, damit zu erklären, daß durch die Vorbehandlung eine größere Empfindlichkeit der Tiere gegen die Infektion eintritt.

Das Facit meiner Versuche wäre danach folgendes:

1) Aus der Bouillonkultur des B. coli kann man 2 Substanzen erhalten, die in chemischer und biologischer Beziehung verschieden sind, ein Nuklein und ein Nukleoalbumin.

2) Das Nuklein ist eine toxische Substanz mit kumulativer Wirkung, deren geringste tödliche Dosis 2 cg pro kg. Tier ist.

3) Das Nuklein verleiht dem Blutserum kein spezifisches, agglutinierendes Vermögen.

4) Das Nukleoalbumin ist eine toxische, nicht kumulativ wirkende Substanz, deren geringste tödliche Dosis 6 cg pro kg. Tier ist.

5) Das Nukleoalbumin verleiht dem Blutserum der Kaninchen spezifische agglutinierende Eigenschaften.

6) Das Nukleoalbumin besteht aus zwei verschiedenen Gruppen, einer toxophoren und durch Wärme zerstörbaren, und einer agglutinogenen, indifferenten und durch Wärme unzerstörbaren. Die Toxophorengruppe nimmt nicht an der Erzeugung des agglutinierenden Vermögens teil. Nur die Agglutinogengruppe besitzt die Eigenschaft, das Blutserum der Kaninchen zu agglutinieren.

7) Mit dem Nukleoalbumin kann man die Kaninchen gegen *B. coli* nicht immunisieren.

Nachdruck verboten.

Ueber eine infektiöse Krankheit beim Genus *Turdus*.

Von Prof. A. Maggiora, Direktor, und Dr. G. L. Valenti, Assistent des hygienischen Institutes der kgl. Universität in Modena.

Im September 1901 zeigte im Gebiete von Modena das Genus *Turdus* eine auffallende Sterblichkeit. Man sah auf dem Lande oft Kadaver von Amseln (*Turdus merula*), von *Turdus viscivorus*, zuweilen auch von *Turdus pilaris* und anderen Arten. Aber auch die Stare (*Sturnus vulgaris*), welche sich schon zur Wanderung anschickten, verfielen einer Krankheit, obwohl nur in geringerem Grade.

Diese Erscheinung gab zu lebhaften Erörterungen im Kreise der Jäger und der Vogelzüchter Veranlassung und sie wurde auch von den lokalen Zeitungen besprochen. Es wurde von einigen behauptet, daß die erwähnten Tiere zu jener Zeit sich hauptsächlich von Weintrauben nähren, welche zum Schutze gegen die *Peronospora viticola* mit schwefelsaurem Kupfer behandelt wurden, und daß es sich um Vergiftung mit schwefelsaurem Kupfer handelte. Andere hingegen hielten dafür, daß es sich um eine seuchenartige Erkrankung handle.

Der ersteren Meinung gegenüber wurde mit Recht eingewendet, daß eine Vergiftung a priori ausgeschlossen werden könne, weil im Gebiete von Modena die Behandlung der Weingärten mit schwefelsaurem Kupfer schon seit mehreren Jahren geübt wurde und unter den Staren, Amseln und anderen Arten, welche sich ja von Weintrauben nähren und oft auch ganze Reihen von Weinstöcken verheeren, während jener Zeit doch nie eine außergewöhnliche Sterblichkeit zu verzeichnen war. Allerdings, wenn es eine Weinlese gab, bei welcher Kupfersalzvergiftungen durch Weintrauben wenig anzunehmen wäre, war diese ohne Zweifel die von 1901, weil in diesem Jahre zur Zeit der Weinlese ein so regnerisches Wetter herrschte, daß die Weintrauben in einer außergewöhnlichen Weise abgespült worden waren, so daß diese dann und wann sogar verschimmelten.

Obwohl alle diese Gründe von unzweifelhaftem Werte sind, so hat

doch der eine von uns während eines Landaufenthaltes in Piemont, wo unter den Vögeln gar keine Sterblichkeit herrschte, zwei singende Amseln, die seit mehreren Monaten im Käfige gehalten worden sind, viele Tage hindurch fast ausschließlich mit Weintrauben genährt, die 8mal hintereinander mit schwefelsaurem Kupfer behandelt worden sind. Diese Tierchen nun, die übri gens auch früher fast jeden Tag so behandelte Weintrauben fraßen, blieben vollständig gesund. Es drängte sich uns deshalb logisch der Gedanke auf, daß wir es in Modena mit einer seuchenartigen infektiösen Krankheit zu tun haben, und wir wurden in dieser Meinung auch durch den Umstand bestärkt, daß in demselben Jahre gegen Ende des Frühlings und im Anfange des Sommers an einigen Orten des Gebietes von Modena eine schwere Seuche von exsudativem Typhus unter den Hühnern herrschte¹⁾. Diese Seuche war erst seit kurzem abgelaufen, und da das Virus des exsudativen Typhus bei Hühnern, wie unsere Experimente gezeigt haben, in hohem Grade ansteckend auf viele kleine Vögel, z. B. auch die Stare, wirkt, so war es natürlich, anzunehmen, daß auf dem Lande an einigen Punkten noch kleine, versteckt gebliebene Infektionsherde vorhanden gewesen seien, von denen die Ansteckung der *Turdidae* und der Stare ausgegangen ist, um so mehr, als die Hühner hier auf dem Lande frei herumgehen, sich oft weit vom Hause entfernen und dann auch weil jene Tierchen zum Teile als halb domestizierte angesehen werden können.

Ende September wurden zwei auf dem Lande tot gefundene Amseln in unser Laboratorium gebracht. Die Untersuchung ergab, daß die Eingeweide derselben sich schon in beginnender Fäulnis befanden, so daß über die Natur der Läsionen, welche den Tod herbeiführten, nichts Sicheres ermittelt werden konnte. Wir sammelten aber das koagulierte Blut, welches im rechten Herzen beider Tiere vorhanden war, machten in einem kleinen Mörser von Glas, der ungefähr 5 ccm einer physiologischen sterilisierten Kochsalzlösung enthielt, eine Emulsion, und injizierten diese in gleicher Quantität in die Brustmuskeln von 2 Hühnern, die das Gewicht von 515 bzw. 525 g hatten (Exper. 1 und 2). Diese Hühner wurden mehr als einen Monat lang in Beobachtung gehalten und sie zeigten sich während dieser Zeit immer vollständig gesund.

Der negative Erfolg dieses Experimentes hat uns wegen der Erfahrungen, von denen wir ausgegangen sind, nicht wenig befremdet. Offenbar steht derselbe in Widerspruch mit dem, was wir bei Staren, Spatzen u. s. w. beobachtet haben, deren Blut mit ganz kleinen Quantitäten des Blutes von an exsudativem Typhus leidenden oder daran zu Grunde gegangenen Hühnern künstlich infiziert wurde; denn das Blut jener Tiere bewahrte, wie unsere früheren Experimente²⁾ zeigen, vollständig seine Virulenz den Hühnern gegenüber, während bei unserem gegenwärtigen Experimente das Gegenteil eintrat, obwohl die Quantität des den beiden Hühnern beigebrachten Blutes eine beträchtliche gewesen ist. Allerdings handelt es sich hier um Tiere, deren Eingeweide schon beginnende Fäulnis zeigten, und die Virulenz des Virus konnte möglicherweise, angenommen daß exsudativer Typhus vorhanden war, wegen des Vorhandenseins von Bakterien auch im Blute zum Teile zerstört worden sein; allein wir hatten auch Gelegenheit, zu sehen, daß der Fäulnisprozeß,

1) Maggiora, A. e Valenti, G., Su una epizoozia di tifo essudativo dei Gallinacci. I. note. (Extract aus den Mem. della R. Accad. di sc. lett. ed arti in Modena. III. Reihe. T. IV. und Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLII.)

2) l. c. p. 40.

wenn er nur im Anfangsstadium sich befindet, die Virulenz einer so großen Quantität des Virus von exsudativem Typhus, wie wir bei unserem Experimente angewendet haben, gewöhnlich nicht ganz zu unterdrücken vermag. Wir mußten deshalb daran denken, daß, wenn die beiden Amseln in der Tat infolge einer infektiösen Krankheit zu Grunde gingen, das spezifische Virus möglicherweise verschieden von dem des exsudativen Typhus der Hühner und daß das Aufeinanderfolgen der beiden Seuchen nur eine zufällige Erscheinung war oder daß das Virus, bei Gleichbleiben der Qualität, aus unbekanntem Ursachen eine derartige Verdünnung erlitt, daß es auf die Hühner nicht mehr pathogen einwirken konnte oder daß dessen Virulenz, trotzdem die Fäulnis erst im Anfangsstadium sich befand, leichter verloren ging.

Am 3. Oktober hatte einer von uns beiden auf dem Lande zwei andere tote Amseln gesammelt. Bei der Untersuchung fanden wir, daß die Baueingeweide bei einer derselben in evidenter Fäulnis waren; abgesehen von einer deutlichen Kongestion einer Lunge und Trübung des Pericardiums, konnten aber keine weiteren Alterationen mit Sicherheit nachgewiesen werden. Die zweite Amsel jedoch war, wie es schien, erst vor wenigen Stunden gestorben und war in gut erhaltenem Zustande. Bei dieser konnten wir neben einem geringgradigen subkutanen Oedeme eine beträchtliche Rötung des Dünndarms nachweisen; ferner waren die Leber, Milz und die Nieren in einem kongestionierten Zustande, das Pericardium zeigte einen perlmutterartigen Glanz, war scheinbar verdickt und enthielt eine kleine Quantität eines serös fibrinösen Exsudats. Auch das Epicardium zeigte Trübung, das rechte Herz war erweitert und enthielt braun gefärbte Coagula; die Lungen waren hyperämisch, die Meningen zeigten eine geringfügige Kongestion, und die Gehirnschubstanz war ödematös. An der Schleimhaut der Mundhöhle, der Nasen- und Rachenhöhle und auch an der Kloakenmündung war nichts Auffälliges zu sehen.

Vom Darminhalte und vom Blute der Leber, der Milz und des Herzens machten wir Kulturen in Fleischbrühe und Flachkulturen in mit Glycerin zubereitetem Agar bei 37° C. Nach 20 Stunden entwickelten sich in den Flachkulturen, die vom Darminhalte und vom Blute gemacht worden waren, zahlreiche Kolonien eines kleinen beweglichen Bakteriums, das wir nach seinem morphologischen Charakter und nach den Eigenschaften, die es in isolierten Kulturen in verschiedenen Nährsubstanzen zeigte, für eine Varietät des *Bacterium coli* ansahen, ähnlich denjenigen Formen, welche aus dem Darminhalte gesunder und auch kranker Hühner, ferner bei Schwalben, Spatzen, Staren, Falken u. s. w. in gesundem Zustande isoliert werden können und von denen wir in unserer vorausgehenden Arbeit gehandelt haben.

Von einer 10 Stunden alten Kultur jenes Bakteriums (aus dem Blute) in Fleischbrühe injizierten wir 2 ccm in die Brustmuskeln eines jungen, 200 g wiegenden Hühnchens (3. Exper.), und einem anderen Huhne von 190 g Körpergewicht brachten wir in derselben Weise 2 ccm einer Kultur derselben Bakterie in Fleischbrühe, aus dem Darminhalte, bei (4. Exper.). Die beiden Hühner blieben vollständig gesund.

Zwei jungen Tauben von einheimischer Rasse (sog. *bastardoni*), von 380 bzw. 355 g Körpergewicht injizierten wir gleichfalls in die Brustmuskeln 1 ccm bzw. 1,5 ccm derselben Kulturen in Fleischbrühe. Sie waren nicht ganz 2 Stunden lang etwas niedergeschlagen, erholten sich aber rasch und blieben gesund (5. und 6. Exper.)

Ein Coagulum aus dem rechten Vorhofe des Herzens jener Amsel,

welche zur Zubereitung der Kulturen diente, wurde zerkleinert, in 2 ccm einer 0,75-proz. sterilisierten Kochsalzlösung gelöst und dann in die Peritonealhöhle eines anderen jungen, 210 g schweren Huhnes injiziert (7. Exper.). Auch dieses Tier blieb gesund. Wir machten dann aus der fein zerteilten Leber derselben Amsel eine Emulsion in ungefähr 6 ccm einer physiologischen Lösung und injizierten davon subkutan 2 ccm einem jungen Kaninchen von 1300 g und einem anderen Kaninchen desselben Wurfes und von 1420 g Körpergewicht gleichfalls 2 ccm in die Peritonealhöhle. Beide Tiere blieben am Leben (Exper. 8 u. 9). Von der noch übrig gebliebenen Emulsion injizierten wir je 1 ccm zwei jungen Tauben (*triganini*) von 215 bzw. 220 g Gewicht. Auch diese Tiere zeigten gar keine Reaktionserscheinungen (Exper. 10 u. 11).

Wir haben bei diesen Experimenten von Vögeln nur junge Hühner und Tauben benutzt, weil uns Vögel von derselben Gattung, zu der die erkrankten gehörten, und von denen wir hätten annehmen können, daß sie von immun gebliebenen Lokalitäten herrührten, nicht zur Verfügung standen. Es geht aus unseren Experimenten hervor, daß das mutmaßliche Virus, von welchem die Sterblichkeit der Vögel abhing, auf die Hühner, obwohl sie sehr jung waren, und obwohl Dosen angewendet wurden, welche die Infektion leicht hätten reproduzieren können, wenn es sich um dasselbe Virus gehandelt hätte, welches wenige Monate früher eine schwere Seuche hervorrief, nicht übertragen werden kann.

Auch die Experimente 8 und 9 an Kaninchen beweisen, daß wir es nicht mit dem Virus der Hühnercholera zu tun hatten, weil sonst die Kaninchen wegen ihrer großen Empfindlichkeit jenem Virus gegenüber und infolge der großen Quantität, die ihnen von der Leberemulsion injiziert wurde, sicher den Experimenten erlegen wären. Wir wollen uns jedoch auf Grund dieser vorläufigen Untersuchungen nicht in weitere Erwägungen einlassen und wir wollen unsere bisherigen Experimente, da sie, wie wir sagten, mit einem unsicheren, weil von tot aufgefundenen Tieren herstammendem Materiale gemacht worden sind und da wir deshalb die Resultate derselben nur mit Vorbehalt beurteilen können, bloß als Versuche ansehen, die dazu dienten, einige Orientierung in der dunklen Frage zu gewinnen.

Mit einiger Schwierigkeit gelang es uns, von Piemont her, aus Gegenden, wo die Hühner und sonstige Vögel von Krankheiten immun waren, einige Amseln, Falken, Spatzen und einen Finken, die ohne Ausnahme ausgewachsen, in Käfigen aufgezogen und vollkommen gesund waren, zu erhalten. Es ist nach unserer Meinung unerläßlich, an vollständig entwickelten Tieren, und zwar solchen, die in Käfigen aufgezogen wurden oder wenigstens seit langer Zeit an die Gefangenschaft gewöhnt sind, zu experimentieren, weil von den Vögeln, die mit Netzen oder sonstwie gefangen werden und an den Käfig nicht gewöhnt sind, viele, wie bekannt, fast plötzlich zu Grunde gehen, und zwar wahrscheinlich infolge einer toxischen Enteritis, die vom Wechsel in der Nahrungs- und Lebensweise abhängig ist, so daß bei Anwendung solcher Tiere in den Experimenten leicht Fehler entstehen können. Die mit Netzen gefangenen erwachsenen Tiere dürften zu Untersuchungen benutzt werden erst, nachdem sie früher viele Tage hindurch in Beobachtung gehalten worden sind.

Einer von uns beiden hatte nun während eines Aufenthaltes auf

dem Lande in der Nähe von Modena Gelegenheit, eine erwachsene Amsel zu fangen, die, wie man nachher erkannte, von der Krankheit befallen war; sie konnte nicht lange fliegen und nach kurzem Nachjagen ließ sie sich fangen. Es wurde dieses Tierchen (ein Weibchen von 95 g Gewicht; Exper. 12) noch lebend ins Laboratorium gebracht, aber es war, wie man deutlich sah, krank, wollte nicht fressen, war unfähig zu fliegen, hielt den Kopf geneigt, das Gefieder war zerzaust, die Augen halb geschlossen; die Mundhöhle bot nichts Besonderes dar und die Faeces waren nicht diarrhöischer Natur; Verletzungen, Knochenbrüche fehlten. Im Verlaufe von 8 Stunden starb das Tier und es wurde sofort die Autopsie desselben vorgenommen.

Die Haut zeigte äußerlich nichts Abnormes, aber sie löste sich mit Leichtigkeit ab, und zwar wegen eines leichten Oedems, das subkutan vorhanden war. Von den Baueingeweiden waren der Dünndarm, die Leber, Milz und die Nieren kongestioniert. Das Pericardium zeigte sich opak, aber ohne ein bemerkenswertes Exsudat; das Herz pulsierte noch und bot keine Hämorrhagieen unter dem Epicardium dar; von den Lungen war die eine normal, die andere kongestioniert, auch die Hirnhäute waren gerötet und die Gehirnsubstanz erschien ödematös. Nach vorsichtiger Eröffnung des Herzens machten wir vom Blute Flachkulturen in Agar und mikroskopische Präparate, die zum Teile in frischem Zustande untersucht, zum Teile auch noch gefärbt wurden. Mittels einer Pasteurschen Pipette aspirierten wir ein wenig Blut und mit einem Bistouri, das ins Blut des Herzens getaucht wurde, wurden subkutane Einstiche in die rechte Brustgegend gemacht an:

zwei Spatzen (Exper. 13 u. 14),

einer Amsel (Exper. 15),

einem Falken (*F. tinnunculus*; Exper. 16).

Von diesen Tieren gingen drei zu Grunde, und zwar fast gleichzeitig nach 42 bzw. 44 Stunden die Amsel und der Falke, nach 4 Tagen einer der Spatzen (Exper. 13); der andere Spatz blieb am Leben.

Die Symptome, welche die drei gestorbenen Tiere während des Verlaufes der Krankheit zeigten, waren gleich denjenigen, welche bei der eigentlichen typhösen Form des exsudativen Typhus der Hühner angetroffen werden. Nach 14--16 Stunden nämlich zeigten sich die Amsel und der Falke stark erschöpft und blieben so bis zum Eintritte des Todes; der Spatz No. 13 hingegen war munter 3 Tage hindurch und erst am 4. Tage begannen auch bei ihm die Zeichen der Erschöpfung und Appetitlosigkeit aufzutreten. Der andere, am Leben gebliebene Spatz flog aus dem Laboratorium, nachdem er 27 Tage lang in Beobachtung gewesen ist.

Die Läsionen, welche die drei Tiere darboten, waren dieselben, welche auch bei der Amsel No. 12 konstatiert werden konnten, d. h. geringes subkutanes Oedem, Kongestionszustand des Dünndarmes, der Leber, Milz und der Lungen, geringgradige Pericarditis (evidenter beim Spatzen) und Kongestionszustand der Meningen. Vom Blute derselben machten wir zahlreiche Präparate in frischem Zustande und auch gefärbte, ferner Kulturen in Fleischbrühe, Flachkulturen in einfachem Agar, in mit Glycerin, Glykose und mit dem Blute von Hühnchen zubereitetem Agar, durch Uebertragung vom Blute des Herzens, der Leber und der Milz.

Bei Untersuchung des Blutes in frischem Zustande konnte man keine tierischen Mikroorganismen nachweisen und auch die Färbung mit

Boraxmethylblau und mit der von Koch modifizierten Romanowskischen Methode ergab diesbezüglich nur negative Resultate.

Die mikroskopische Untersuchung auf Bakterien machten wir an Präparaten, die in Formalin fixiert und mit der Ziehlschen stark verdünnten Flüssigkeit längere Zeit hindurch gefärbt worden sind, aber trotz der genauesten Prüfung des Blutes der Amsel No. 12 und auch der Tiere No. 13, 15 und 16 mit Zeiss, Apochrom. 2,0 mm, konnten wir gar keine Bakterien nachweisen, und auch die Untersuchung der Präparate, welche vom perikarditischen Exsudate gemacht oder durch Bestreichen der Deckgläschen mit Teilchen von der Leber und von der Milz gewonnenen und nachher in der erwähnten Weise behandelt worden sind, ergab nur negative Resultate.

Die Kulturen sowohl in Fleischbrühe wie auch die Flachkulturen, die wir bei 37,5° C hielten und im Laufe von 7 Tagen zu wiederholten Malen untersuchten, blieben steril.

Experimente mit successiven Uebertragungen.

Mit der Spitze des Messers, womit das Herz der Amsel No. 15 eröffnet wurde, um die Pipette von Pasteur zur Aufsaugung von Blut einführen zu können, machten wir in der Brustgegend einer anderen Amsel subkutan eine kleine Wunde. Es starb dieses Tier nach 38 Std. (Exper. 17). Von der Leber und Milz dieser Amsel, die wir in einem Mörser zerkleinerten, wurde mit 10 ccm einer physiologischen sterilisierten 0,75-proz. Kochsalzlösung eine Emulsion gemacht, und von dieser Emulsion injizierten wir:

a) einem Falken 1 ccm in die Peritonealhöhle; es starb das Tier nach 39 Stunden (Exper. 18);

b) einer Amsel je 0,5 ccm in die Brustmuskeln der beiden Seiten (Exper. 19). Tod nach 36 Stunden;

c) 0,5 ccm in derselben Weise zwei Spatzen (Exper. 20 und 21). Exper. 20 blieb am Leben, bei Exper. 21 trat nach 81 Stunden der Tod ein;

d) 0,5 ccm einem Finken, wie bei dem vorausgehenden Experimente (Exper. 22). Das Tier blieb am Leben;

e) einem jungen Kaninchen von 520 g Gewicht 1 ccm in die Peritonealhöhle. Das Tier blieb am Leben (Exper. 23);

f) zwei jungen Meerschweinchen von 145 bzw. 160 g Gewicht je 1 ccm in die Peritonealhöhle. Auch diese Tiere blieben am Leben (Exper. 24 und 25);

g) von zwei weißen Mäusen (*Mus musc. alb.*) einer 0,3 ccm subkutan, der anderen dieselbe Quantität in die Peritonealhöhle. Die Tiere blieben am Leben (Exper. 26 und 27).

Vom Blute aus dem rechten Herzen der Amsel No. 15 wurde eine Emulsion in 3 ccm einer physiologischen Kochsalzlösung gemacht und von dieser Emulsion injizierten wir 0,5 ccm in eine Vene des linken Flügels eines jungen Huhnes von 320 g; den Rest der Emulsion injizierten wir in die Brustmuskeln einer jungen Taube einer heimischen sog. Bastardona-Rasse von 250 g Gewicht. Auch diese Tiere blieben am Leben (Exper. 28 und 29).

Die Amseln No. 17 und 19, der Falke No. 18 und der Spatz No. 21, welche infolge der Infektionen zu Grunde gingen, zeigten dieselben entzündlichen Erscheinungen, wie die Amsel No. 12), welche auf natürlichem Wege erkrankte, nur mit dem Unterschiede, daß der

Falke, dem wir in das Peritoneum injizierten, eine intensivere Reaktion von seiten des Peritoneums und der Eingeweide der Bauchhöhle zeigte, während bei den Amseln und bei dem Spatzen, denen in die Brustmuskeln injiziert wurde, namentlich aber beim Spatzen, eine zirkumskripte, aber deutliche entzündliche Reaktion mit akuter fettiger Degeneration einiger Muskelbündel an den Injektionsstellen vorhanden war; außerdem konstatierten wir im Pericardium des letzteren Tieres einen gelblichen serös-fibrinösen Erguß.

Bei den vier gestorbenen Tieren No. 17, 18, 19 und 21) prüften wir das Blut des Herzens, der Leber und der Milz an Präparaten, die in der angeführten Weise gefärbt wurden, und machten Kulturen in Fleischbrühe und in Agar, aber immer mit negativem Erfolge.

Es geht aus unseren Experimenten hervor, daß durch Injektion kleiner Quantitäten vom Blute der Amsel, die infolge einer spontan entstandenen Krankheit zu Grunde ging, die gleiche Krankheit bei anderen *Turdidae* und auch bei anderen prädisponierten Vögeln hervorgebracht werden kann; dasselbe erzielt man successiv durch Uebertragung des Blutes und der Emulsion aus den Eingeweiden von Vögeln, die auf experimentellem Wege erkrankten.

Wir haben es hier also mit einer Infektion zu tun.

Das spezifische Virus derselben hat seinen Sitz vornehmlich im Blute, und die Infektion kann daher zur Gruppe der septikämischen Infektionen gerechnet werden. Beim successiven Uebergang des Virus in dieselben Arten, welche zur Erkrankung disponiert sind, scheint das Virus an Intensität zuzunehmen, indem der Tod der Tiere in kürzerer Zeit erfolgt. Von den Vögeln, an denen wir experimentierten, zeigten sich ansteckungsfähig neben den Amseln in sehr deutlicher Weise auch die Falken; nur in geringerem Grade die Spatzen, von denen nur ein Teil, und zwar nach längerer Zeit als die Falken, zu Grunde ging.

Von kleinen Säugetieren zeigten sich Kaninchen, Meerschweinchen und weiße Mäuse nicht ansteckungsfähig.

Es gelang uns nicht, das spezifische Agens der in Rede stehenden Infektion mit dem Mikroskope nachzuweisen und auch die Kulturversuche mit künstlichen Nährsubstraten blieben erfolglos.

Filtrierung des Virus durch den Berkefeldschen Filter.

Nachdem wir vergebens den Nachweis des Virus der *Turdidae* mittels des Mikroskopes und die Kultur desselben versucht haben, nachdem auch die Versuche mit anderen Nährsubstraten und mit anaëroben Kulturen fruchtlos geblieben waren und wir von weiteren ähnlichen Experimenten keine positiven Erfolge erwarten konnten, dachten wir daran, einige Filtrationsversuche zu machen, um zu sehen, ob das Virus der *Turdidae*, das eine gewisse Analogie mit dem des exsudativen Typhus der Hühner zeigte, gleich diesem, durch anaërobe Filter hindurchgehen könne oder nicht. Es lag uns daran, diese Versuche sobald als möglich durchzuführen, einestheils wegen des großen Interesses, das sie darboten, andernteils, weil unser Vorrat an zweifellos gesunden Amseln und Falken klein war und wir keine anderen finden konnten; ferner, weil die Spatzen, abgesehen davon, daß sie weniger ansteckungsfähig sind, bloß eine geringe Quantität Blut geben und die organischen makroskopischen Läsionen in derartig kleinen Tieren nicht immer in klarer Weise interpretiert werden können. Das Blut vom Herzen der Amsel No. 18 und des Falken No. 19 gaben wir in 8 ccm einer sterilisierten physiologischen Koch-

salzlösung, in der sich auch, fein zerteilt, das Herz, die Leber und die Milz derselben Vögel befanden; der gut gemischten Flüssigkeit setzten wir noch einige Tropfen einer frischen Kultur in Gelatine eines violett gefärbten Bacillus, der aus dem Wasser eines Brunnens von Modena isoliert wurde und dem Schröterschen Bacillus ähnlich war, zu. Dann mischten wir nochmals und gaben das Ganze auf einen kleinen Berkefeldschen Filter, der im Eiskeller gehalten und sich selbst, d. h. ohne Anwendung von Aspiration, überlassen wurde. Nach 12 Stunden war die Flüssigkeit fast ganz durchgegangen und das vollständig klare Filtrat erschien bloß leicht hämoglobinartig rot gefärbt.

Von diesem Filtrat injizierten wir je 1 ccm in die beiderseitigen Brustmuskeln einer Amsel (Exper. 30); ferner 1 ccm in die Peritonealhöhle eines Falken (Exper. 31). Beide Tiere gingen zu Grunde, das erste nach 59, das zweite nach 53 Stunden, und zwar unter denselben Erscheinungen von Niedergeschlagenheit, welche bei denjenigen Tieren beobachtet wurde, denen wir Blut in toto injizierten. Die Kulturen mit dem Filtrate blieben steril. Die mikroskopische Prüfung und die Kulturen des Blutes der Tiere 30 und 31 ergaben negative Resultate und in den Organen derselben konnten die oben angegebenen phlogistischen Alterationen erkannt werden. Mittels einer Impfnadel, die wir in das Blut der Amsel No. 30, die infolge der Injektion mit dem Filtrate starb, eintauchten, inokulierten wir subkutan in die Brustgegend einer anderen Amsel. Es starb dieses Tier nach 44 Stunden unter denselben Symptomen und unter den gleichen Läsionen, welche die anderen an Infektion zu Grunde gegangenen Vögel zeigten (Exper. 32). Auch die Kulturen, welche mit dem Blute der Amsel No. 32 gemacht worden sind, blieben steril, und auch die mikroskopische Prüfung des Blutes blieb resultatlos.

Es zeigen die Experimente 30 und 32, daß das Virus den Berkefeldschen Filter passieren kann und hierbei die Fähigkeit, sich zu vermehren und prädisponierte Tiere zu infizieren, nicht einbüßt.

Verabreichung des Virus auf dem Wege des Darmkanals, von der Mundöffnung aus.

Einer Eule (*Strix bubo*), die, obwohl sie schon seit mehr als 6 Monaten in Gefangenschaft lebte, wegen ihrer Wildheit und der Kraft der Krallen sich nicht gut zu Inokulationen durch Punkturen eignete, haben wir, nachdem wir uns von dem guten Gesundheitszustande derselben überzeugt haben, Eingeweide und Fleisch von der Amsel No. 32 verabreicht. Nach 10 Stunden begann die Eule Appetitlosigkeit zu zeigen, verkroch sich, hatte die Federn zerzaust; die Abgeschlagenheit derselben nahm immer zu, bis ein komatöser Zustand und schließlich, 45 Stunden nach Einführung des infizierten Fleisches, der Tod eintrat. Bei der Autopsie sah man, daß eine deutliche Kongestion der Baueingeweide, intensiver Kongestionszustand der Lungen und Opacität des Pericardiums vorhanden war; in letzterem befand sich ein gelbliches, serös-fibrinöses Exsudat.

Vom Blute und von dem perikarditischen Exsudate sowie auch vom Saft der Leber und der Milz wurden mikroskopische Präparate gemacht, frisch und auch gefärbt untersucht; aber es konnten keine Bakterien nachgewiesen werden und auch die Kulturen des Blutes blieben steril (Exper. 33). Das Blut der Eule sammelten wir in Röhrchen, die mittels der Lampe verschlossen wurden, und mittels einer Impfnadel, die in

dasselbe getaucht wurde, machten wir eine subkutane Punktur in die Brustgegend beim letzten Falken, den wir zur Verfügung hatten. Es starb dieses Tier nach 35 Stunden unter denselben klinischen Symptomen und mit den gleichen anatomischen Läsionen, welche auch die anderen Tiere zeigten (Exper. 34). Die mikroskopische Prüfung des Blutes und die Kulturen erwiesen sich auch hier resultatlos. Doch wollten wir noch einen Versuch am Huhne machen, um zu sehen, ob das Virus nach den stattgehabten Uebertragungen eventuell eine Virulenz sich aneignete, welche es im Beginne nicht zeigte. Wir haben deshalb einem Huhne von 390 g 0,5 ccm vom Blute des Falken No. 34 nach Verdünnung in einer geringen Quantität einer 0,75-proz. physiologischen Kochsalzlösung in die Brustmuskeln injiziert. Aber trotz der großen Quantität des injizierten Virus blieb das Huhn vollkommen gesund (Exper. 35).

Es beweisen die Exper. 33 und 34, daß das Virus auch bei Verabreichung durch die Mundhöhle eine Infektion hervorzurufen vermag.

Unsere Experimente mußten längere Zeit hindurch (mehr als 5 Monate) in diesem Stadium verbleiben, weil wir keine anderen *Turdidae* und Falken zur Verfügung hatten. Wir hofften allerdings, daß das in geeigneter Weise, d. h. in Pasteurschen Pipetten in kalten und finsternen Lokalitäten aufbewahrte Virus uns die Fortsetzung der Beobachtungen erlauben würde; wir hofften dies aus Analogiegründen, weil nämlich das Virus des exsudativen Typhus der Hühner nach Experimenten, die wir demnächst veröffentlichen werden, mehrere Monate lang zu widerstehen vermag, wenn dasselbe in der angegebenen Weise konserviert wird. Wir fanden aber, daß das Blut, obwohl es anscheinend gut konserviert war, seine Aktivität als echtes Virus vollständig eingebüßt hatte. Denn von zwei jungen Falken (Exper. 36 u. 37), von denen wir am 24. Juni 1902 dem einen 1 ccm, dem anderen 0,35 ccm einer verdünnten Lösung von Blut (1:3) in physiologischer Kochsalzlösung von der oben genannten Eule (*Strix bubo*) injizierten, starb der erste nach 6, der zweite nach 12 Stunden, unter Intoxikationserscheinungen (Erbrechen, Erschöpfung u. s. w.), welche unmittelbar nach der Injektion auftraten und bis zum Tode andauerten. Die Nekroskopie ergab bei den Falken 36 und 37 keine nennenswerten Läsionen. Zwei andere Falken von demselben Neste, denen bloß ein Tropfen des Blutes derselben Eule beigebracht wurde, zeigten hingegen gar keine Reaktionserscheinungen.

Das Blut der Falken No. 36 und 37 erwies sich nicht als pathogen für andere Tiere derselben Art. Seine Aktion wurde also zu einer toxischen reduziert und zeigte nicht die Eigenschaften eines Virus.

Obwohl unsere Experimente in vieler Hinsicht unvollkommen sind, so haben wir sie doch publiziert, um die Aufmerksamkeit der Bakteriologen auf die Seuche der *Turdidae* zu richten, weil es uns nämlich scheint, daß das Argument weitere Studien, und zwar in sehr ausgehnter Weise, verdiene.

Es scheint uns, aus den gemachten Experimenten die folgenden Schlüsse ziehen zu können:

- 1) Die lebend gefangene und dann in unserem Laboratorium zu Grunde gegangene Amsel hatte eine Infektionskrankheit von der Gruppe der Septikämieen. Wegen der Aehnlichkeit der Läsionen bei derselben

mit denjenigen Läsionen, welche bei den tot aufgefundenen und bei den experimentell infizierten Vögeln angetroffen wurden, kann man schließen, daß es sich um eine seuchenartige Infektion handelte.

2) Das spezifische Virus, obwohl es im Blute bestimmt vorhanden war, konnte mit dem Mikroskope nicht nachgewiesen und auch nicht auf den künstlichen Nährsubstraten kultiviert werden; es geht jedoch durch den Berkefeldschen Filter hindurch, und zwar nicht als toxische Substanz, sondern als wirkliches Virus, das sich zu vermehren und prädisponierte Tiere zu infizieren vermag.

3) Von den uns zur Verfügung gestandenen Tieren erwiesen sich ansteckungsfähig nebst der Amsel der Falke und die Eule, weniger die Spatzen und die Tauben; das Huhn, das Kaninchen, das Meerschweinchen, die weiße Maus erwiesen sich refraktär. Auch ein Finken blieb trotz der Inokulation am Leben.

4) Infolge der Passagen des Virus durch prädisponierte Tiere hindurch steigerte sich bei diesen die Virulenz desselben.

5) Die Infektion kann experimentell durch Injektionen kleiner Quantitäten von Blut oder von Emulsionen, die man aus den Eingeweiden der infizierten Tiere bereitet, übertragen werden, aber auch auf dem Wege des Darmkanales, von der Mundhöhle aus.

Ueber die Art und Weise, in der die Infektion mit seuchenartigem Charakter unter natürlichen Bedingungen sich verbreitet, können wir nichts Bestimmtes aussagen; wir halten es jedoch für wahrscheinlich, daß außer dem direkten und indirekten Kontagium dabei der Einfluß von Insekten oder von Würmern mit im Spiele ist, die als natürliches Substrat für die Kultur des Virus und gleichzeitig zur Nahrung der Vögel dienen oder diese in anderer Weise anstecken können.

Ebensowenig können wir mit Bestimmtheit die Frage, die wir uns gleich im Beginne stellten, beantworten, ob nämlich das Virus, welches bei der Infektion der *Turdidae* wirksam ist, eine pathogene Individualität darstellt, oder ob dasselbe bloß als eine Varietät des exsudativen Typhus der Hühner, welche sich den angeführten Vogelarten adaptiert, angesehen werden muß.

Das Aufeinanderfolgen der Seuchen spricht eher für die letztere Annahme. Allein wir glauben, daß, abgesehen von der vollständigen Unschädlichkeit des Virus der *Turdidae* gegenüber den Hühnern, auch bei subkutaner Injektion beträchtlicher Quantitäten oder bei Injektion in die Venen eines Virus, das selbst eine stark entwickelte Eule zu infizieren vermochte, und auch abgesehen von der geringeren Resistenzfähigkeit, welche das Virus der *Turdidae* im Vergleiche mit dem Virus der Hühner bei der Konservierung unter denselben Umständen zeigt, die geringgradige Virulenz des Virus der *Turdidae* bei den Spatzen und seine Unschädlichkeit beim Finken, während im Gegenteile das Virus der hühnerartigen Vögel in hohem Grade pathogen auf die Spatzen und im allgemeinen auf kleine Vögel einwirkt, nicht dafür spricht, daß wir es mit einer Varietät des Virus der Hühner zu tun haben. Es scheint uns vielmehr rationeller, anzunehmen, daß es sich um ein besonderes Virus handelt und daß das Aufeinanderfolgen der beiden Seuchen bloß als eine zufällige Erscheinung aufgefaßt werden muß.

Nachdruck verboten.

Studien über den Vaccineerreger. I

Von Prof. H. Bonhoff, Marburg a. L.

(Schluß.)

Die Unmöglichkeit, pflanzliche Organismen als Erreger der akuten Exantheme nachzuweisen, hat bekanntlich dazu geführt, nach Protozoen zu suchen; im Laufe des letzten Jahrzehnts sind zahlreiche Arbeiten nach dieser Richtung veröffentlicht, Photogramme wiedergegeben und mehr oder weniger undeutliche Beschreibungen des gesehenen Parasiten gedruckt worden. Es ist nicht meine Absicht, an dieser Stelle auf die erwähnten Veröffentlichungen einzugehen. Dieselben sind von van der Loeff und L. Pfeiffer bis auf Funk und japanische Autoren so häufig reproduziert worden, daß man sie mit Fug als bekannt voraussetzen darf. Hier will ich nur eine eigene Versuchsanordnung kurz beschreiben, die bezweckte, nach der obigen Richtung hin ein Weiterkommen zu ermöglichen. Da auch diese Arbeiten mich lange Zeit beschäftigt haben, wird es erlaubt sein, den bei dem Vorgehen leitenden Gedanken wenigstens in Kürze mitzuteilen.

Bei Versuchen, einzellige tierische Organismen, wie sie in jedem Schmutzwasser sich finden, Amöben, Flagellaten, Ciliaten, in künstlicher Nährlösung zur Anreicherung und dann vielleicht zur Isolierung zu bringen, hatte ich gesehen, daß albumosenhaltige Nährböden ohne Salzzusatz und ohne die Extraktivstoffe des Fleisches sich besonders geeignet erwiesen, eine Vermehrung der genannten Protozoen herbeizuführen. Neben letzteren fanden sich immer sehr zahlreiche Bakterienarten; aber die Gesamtmenge der pflanzlichen einzelligen Gebilde war wesentlich geringer als in unseren gebräuchlichen Nährmedien, es kam nicht zu einer völligen Unterdrückung der Protozoen durch die schnelle Vermehrung und die daraus folgende Beschlagnahme des gesamten Nährmaterials, vielleicht auch durch Stoffwechselprodukte von seiten der Bakterien. Daß es mit Hilfe der verschiedenen Albumosen gelingt, gewisse Amöben in Symbiose mit nur einer einzelnen Bakterienart zu erhalten und in beliebiger Generationszahl auf künstlichem Nährboden fortzuzüchten, ist durch eine in meiner Abteilung von Zaubitzer angefertigte und im Archiv für Hygiene erschienene Arbeit mitgeteilt worden. Ich kann hinzufügen, daß auch andere Amöben und eine Ciliatenart sich in Symbiose mit nur einer Bakterienart auf Albumosen längere Zeit haben fortzuzüchten lassen; daß es mir aber trotz zahlreicher Versuche mit amöbenhaltigem, vom menschlichen Körper stammendem Material, hauptsächlich Dysenteriestühlen, die Amöben enthielten, auch neuerdings niemals gelungen ist, eine Kultur, eine Vermehrung solcher Amöben auf künstlichem Nährboden zu erhalten.

Damals, als ich die Beobachtung der Vermehrung tierischer Gebilde auf künstlichem Substrat gemacht hatte, erschien es nicht aussichtslos, zu versuchen, ob die von verschiedenen Autoren beschriebenen, in dem Pockengrund angeblich vorhandenen „Amöben“ nicht ebenfalls durch Symbiose mit irgend einer Bakterienart auf albumosenhaltigem Nährboden zur Vermehrung gebracht werden könnten. Natürlich mußte auch hier der Nährboden nach mancher Richtung hin variiert, es mußten

verschiedenste Bakterienarten versucht und das Aussaatmaterial zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung der Pocke und von verschiedenen Tierspezies entnommen werden, wenn man den Gedanken in ausreichender Weise verfolgt haben wollte. Ueber den letztgenannten Punkt kann ich hinweggehen, er deckt sich mit dem oben bereits Ausgeführten. An Bakterienarten sind fast alle in unserer Sammlung befindlichen nach und nach durchprobiert worden, also ungefähr 100 verschiedene Arten; daneben auch einige Hefezellen und Fadenpilze. Was die Variation des Nährbodens betrifft, so liegt zunächst eine ziemliche Anzahl von Albumosen vor, die geprüft werden mußten. Die von Grübler in Leipzig bezogenen, in den Versuchen benutzten Produkte der Eiweißverdauung waren:

Heteroalbumose, Syntonin, Protalbumose, Deuteroalbumose, Propepton, Antipepton, Hemialbumose, Amphopepton.

Außerdem kamen noch einige käufliche Produkte, die zu bakteriologischen Versuchen schon mehrfach herangezogen sind, vor allem Somatose und Nährstoff Heyden zur Verwendung.

Mit der Heranziehung dieser mehr oder weniger unter sich verschiedenen Präparate, die also auch allein für sich in Lösung zur Verwendung kamen, war die Möglichkeit der Variation des Nährbodens keineswegs erschöpft. Die Hauptsache erschien mir vielmehr, diese Albumosen mit menschlichen oder tierischen Körpersäften in verschiedenen Verhältnissen zu mischen, um so am ehesten eine Gewähr für eine möglichst die Vermehrung der Parasiten begünstigende Zusammensetzung zu erhalten. Selbstverständlich mußte auch hier stets das Körpermaterial von nicht immunen Individuen stammen. Blutserum vom Menschen (Placentarblut) und Kalbe, ferner Alkaliextrakte des Blutkuchens, in ähnlicher Weise hergestellt, wie oben für die Extrakte der wichtigsten Körperorgane angegeben, stellen die hauptsächlich in Betracht gezogenen Zusätze zu den genannten Albumosen oder die Lösungsmittel für dieselben dar.

Jedes Nährmaterial wurde längere Zeit, bis zu 14 Tagen, aufbewahrt und jeden zweiten Tag genau untersucht. Auch der Möglichkeit der Anaërobiose, des Wachstums nur bei einer der Hauttemperatur näher liegenden Wärme von etwa 32° C, der eventuellen Schädigung der Parasiten durch auch nur kurz dauernde Abkühlung in dem Sinne, daß sie dadurch die Fähigkeit der Vermehrung auf künstlichem Nährboden verlören — ein sehr unwahrscheinlicher Umstand, wenn man die hohe Resistenz des Pockenvirus gegen alle möglichen Schädigungen bedenkt — ist Rechnung getragen worden.

In den flüssigen Nährböden, die neben Albumosen menschliches oder tierisches Blut, nicht Serum allein, sondern auch die Blutkörperchen, und keinen Salzzusatz enthielten, habe ich kurze Zeit geglaubt, Gebilde zu erhalten, die körperfremdes Material darstellten. Wenn man zu einem kochsalzfreien, aus 1 Proz. Somatose oder „Heyden“ bestehenden Nährboden Blut aus der eigenen Fingerbeere oder Säugetierblut steril zufügt in Mengen von ca. 5—10 Tropfen auf etwa 5 ccm, das Röhrchen in den Brutschrank für 2—24 Stunden einstellt und nach den angegebenen Zeiträumen mit einem Tropfen der sich infolge der Hypisotonie der Lösung sofort lackfarben präsentierenden Hämoglobinflüssigkeit mikroskopische Präparate herstellt, die nach Fixation durch absoluten Alkohol mit 1-proz. wässriger Eosinlösung gefärbt werden, so bekommt man Bilder, die mit das Schönste darstellen, was man an Artefakten sehen kann.

Das Discoplasma der Erythrocyten ist vielfach in Scheibenform erhalten und hat auch den Farbstoff in mehr oder weniger abgeschwächtem Maße aufgenommen. Von einzelnen der Erythrocyten gehen feine Fortsätze von sehr verschiedener Länge aus, zuweilen in Einzahl und dann meist kurz, zuweilen mehrere von enormer Länge, wobei das Blutkörperchen selbst sehr viel kleiner geworden ist. Die Länge der etwa im Durchschnitt 1μ dicken Fortsätze kann das Vierfache und noch mehr des Durchmessers eines normalen roten Blutkörperchens betragen. Alle diese Dinge sind lange bekannt und oft beschrieben, haben auch schon oft genug zu Irrtümern Veranlassung gegeben. Eine Eigentümlichkeit aber scheint mir noch nicht in der Präganz beobachtet zu sein, wie ich sie so oft in meinen Präparaten gesehen habe. Es gibt nämlich darin eine beträchtliche Anzahl freier Fortsätze sehr verschiedener Länge und dieselben haben an einer oder mehreren Stellen ganz deutliche kugelige oder eiförmige Verdickungen, so daß derartige Gebilde, besonders wenn die dickeren Stellen an dem freien Ende der Fäden liegen, im höchsten Grade Ähnlichkeit mit den Mikrogameten der Malariaparasiten besäßen, wenn sie eben nicht acidophil wären.

Auch im hängenden Tropfen kann man derartige freie Fortsätze des Protoplasmas der Erythrocyten mit den verdickten Stellen, manchmal nur als ganz schattenhafte Gebilde, zuweilen aber sehr viel deutlicher hervortretend als die Schatten der Erythrocyten selbst, ganz gut erkennen. Ich habe sogar einige Male eine zweifellose langsam gleitende Ortsveränderung an diesen freien Fäden beobachtet, die durch Strömungen der Flüssigkeit nicht bedingt waren, da kleine in nächster Nähe der Fäden liegende Gebilde, Körnchen, Schatten von Poikilocyten, ihren Ort bewahrten. Seitliches Ausschlagen der Fäden kann man außerdem sehr oft beobachten.

Es ist selbstverständlich, daß es sich bei den fraglichen Gebilden um nichts anderes handelt, als um Teile des Discoplasmas der Erythrocyten, die sich von dem Zelleibe losglöst hatten, wahrscheinlich kurz bevor der Tod des lebenden Protoplasmas durch Inanition eintrat. Zuweilen schien der ganze Zelleib in eine größere Anzahl solcher Fäden sich aufzulösen. Irgend welche pathogene Bedeutung kommt diesen Dingen natürlich nicht zu, da man sie jederzeit aus jedem menschlichen und Säugetierblut erzeugen kann. Wer sich dafür interessiert, zu erfahren, wie oft derartige Gebilde bereits zu Irrtümern Veranlassung gegeben haben, den bitte ich, den Vortrag von Kollmann, Leipzig auf dem X. internationalen Kongreß zu Berlin 1891 (Verhandlungen II. 5. p. 64—66) über Pseudomikroben des normalen menschlichen Blutes zu lesen. Man wird erstaunt sein, zu sehen, welche ausgezeichneten Namen sich unter den dem Irrtum verfallenen Autoren befinden.

Ueber das Resultat der Versuche, die „Amöben“ der Vaccinestubel durch Symbiose mit Bakterien auf den beschriebenen Nährböden zu züchten, kann ich mich in zwei Worten aussprechen: völlig negativ. Auch nicht einmal ein Ansatz zu irgend etwas anderem als Bakterienwachstum hat sich auffinden lassen. Wenn die Erreger der Kuhpocken „Amöben“ sind, so gehören diese Amöben zu denen, die streng parasitisch veranlagt sind und auf künstlichem Substrat versagen.

Aber es liegt meines Erachtens vorläufig ein zwingender Grund überhaupt nicht vor, niederste tierische Lebewesen als Erreger der Vaccinestubel anzuschuldigen. Daß wenigstens die Eigenschaften der bisher

bekannt gewordenen verschiedenen Protozoen, der Rhizopoden und Infusorien so gut wie der Sporozoen, als Analoga für die Qualitäten der unbekanntem Krankheitserreger nicht dienen können, darf wohl mit Sicherheit angenommen werden. Weder die Mast- oder Fettzellen oder die degenerierten Epidermiszellen der Haut, die als sporengefüllte Kapseln beschrieben sind, noch die Guarnierischen Körperchen haben die wissenschaftliche Welt zu überzeugen vermocht. Daß letztere mit Amöben gar nichts gemein haben, daß der Mangel jeder Entwicklung bei ihnen gegen ihre Einreihung unter die Rhizopoden spricht, ist durch Hückel deutlich genug ausgesprochen. Wenn es sich um Gebilde handelte, die einen Entwicklungszyklus etwa in ähnlicher Weise aufwiesen, wie die Malariaparasiten oder die von Schaudinn und Siedlecki genau beschriebenen Coccidien, *Adelea ovata* und *Coccidium Schneideri*, so würde es den vereinten Bemühungen von Zoologen und Medizinern längst gelungen sein, größere Klarheit zu schaffen. Neuerdings ist nun aber auch der Hauptgrund für die Inanspruchnahme der Guarnierischen Körperchen als Vaccineerreger, ihre Spezifität, wieder fraglicher geworden. Sikowsky behauptet, ganz die gleichen Gebilde auf der Hornhaut von Kaninchen mit erhitzter Lymphe, mit Kaninchenserum und mit Diphtheriegift erhalten zu haben. Da bezüglich erhitzter Lymphe ein negatives Resultat v. Wasielewskis bereits vorliegt, wird man eine Bestätigung der Angaben Sikowskys abzuwarten haben. Aber auch wenn dieselbe ausbleiben sollte, ist eine absolute Spezifität der Guarnierischen Körperchen für Vaccine nicht erwiesen, da vorläufig der Angabe E. Pfeiffers, dieselben Gebilde nach Impfung von luetischen Produkten erzeugt zu haben, meines Wissens wenigstens von keiner Seite entgegengetreten ist.

Nehmen wir aber selbst an, die spezifische Bedeutung der Guarnierischen Körperchen für Vaccine und Variola werde sichergestellt, so scheint der Schluß, daß diese Gebilde auch nur mit Wahrscheinlichkeit als Erreger der genannten Krankheit anzusehen seien, nach dem vorliegenden Tatsachenmaterial durchaus unberechtigt. Will man sie nicht als Leukocyten oder Zerfallsprodukte solcher deuten, so bleibt die Möglichkeit, daß diese Gebilde nichts anderes sind als Veränderungen des Protoplasmas der Cornealepithelien, hervorgerufen durch die Wirkung des aus irgend einem Grunde unsichtbaren eigentlichen Krankheitserregers.

Mit dem bisher Geschilderten sind die von mir eingeschlagenen Richtungen der Untersuchung nicht erschöpft. Nicht immer ist soviel Zeit und Mühe dabei nötig gewesen, wie in den drei eben mitgeteilten Stichproben. Oft war das Aufgeben des Weges schon nach kürzerem Marsche geboten. Ich will auf alle diese anderen Abwege jetzt nicht und niemals eingehen. Im folgenden will ich vielmehr diejenige Methode, und nur diese, beschreiben, welche mir jetzt geeignet erscheint, in das Dunkel, das über der Aetiologie so zahlreicher Infektionskrankheiten liegt, etwas mehr Licht zu bringen.

Die Ueberzeugung hatten mir meine bisherigen Versuche gebracht, daß man von einer Vermehrung der Parasiten auf künstlichem Substrat zunächst werde ganz absehen müssen. Es blieb die Möglichkeit, auf natürlichem Material, also dem lebenden Körper, eine Vermehrung der Krankheitserreger, natürlich in anderer Weise als bisher, also nicht in den Zellen der Oberhaut, zu versuchen.

Dieser Gedanke ist seither bereits in einigen Experimenten von anderer Seite, allerdings zum Teil bei anderen Affektionen, zu Tage getreten. Man hat aufgehört, in der Tatsache der Nichtzüchtbarkeit auf künstlichem Nährboden eine unübersteigliche Schranke für unsere weitere Erkenntnis auf dem Gebiete nichtbakterieller und nichtprotozoischer Krankheitserreger zu erblicken. Das Leitmotiv ist dabei meist in der Anschauung zu finden, daß, wie Pflüger wohl zuerst ausgesprochen hat, „lebendes“ Eiweiß den streng parasitisch veranlagten unbekanntem Infektionserregern angeboten werden müsse, wenn man eine Vermehrung derselben erleben wolle. Was man sich unter „lebendem“ Eiweiß vorzustellen hat, ist dabei nicht ganz leicht zu sagen. Wahrscheinlich soll damit nur dokumentiert sein, daß ein wesentlicher Unterschied in der Nährfähigkeit für Parasiten und wohl auch in der Zusammensetzung bei dem funktionierenden Protoplasma einerseits und dem in den Körperflüssigkeiten hauptsächlich vorhandenen Zerfalls- und Abnutzungsprodukten andererseits besteht.

Um das nächstliegende Beispiel zuerst anzuführen, so hat Schüller in seinen Untersuchungen über die Aetiologie des Carcinoms und Sarkoms sich in empfehlenswerter Weise des die Geschwülste umgebenden normalen Gewebes als Nährbodens für seine Parasiten zu bedienen versucht. Ob der Versuch erfolgreich war, steht vorläufig noch dahin. Schüller selbst gibt bekanntlich an, daß er eine beträchtliche Vermehrung des geschwulsterzeugenden Fremdkörpers gesehen habe. Jedenfalls ist das Verfahren nur für bestimmte Fälle anwendbar, es würde bei Vaccinepusteln z. B. wegen der unvermeidlichen Bakterieneinwanderung einen Fortschritt nicht bedeuten.

Eine weitere Methode, sich „lebendes“ Eiweißes zu bedienen, besteht in der Verwendung des von Nocard und Roux bei der Züchtung des Erregers der Lungenseuche des Rindes mit Erfolg angewendeten Collodiumsäckchens, das unter allen Kautelen in die Bauchhöhle von Tieren, z. B. Kaninchen, gebracht wird, welche eine auf natürliche Weise erlangte Immunität gegen die betreffende Erkrankung besitzen. „In der Voraussetzung, daß die Immunität auf der Zerstörung der Krankheitserreger durch die Phagocyten beruhe, brachten jene Forscher das Virus, um es der Wirkung der Zellen zu entziehen, in Collodiumsäckchen gehüllt, Kaninchen in die Bauchhöhle. Kurze Zeit darauf konnten sie in den mit der Lymphe des Kaninchens durchtränkten Säckchen die Entwicklung winziger Bakterien konstatieren, welche die spezifischen Erreger der Lungenseuche . . . darstellen¹⁾.“ Ich habe in zweimaligem Experiment versucht, ob dieses Verfahren sich zur Züchtung des Vaccineerregers auf lebendem Substrat eignet, habe dazu allerdings nicht Kaninchen, sondern Meerschweinchen benutzt. Das Resultat war in diesen beiden Fällen, in denen das Säckchen 6 Tage in der Bauchhöhle der Meerschweinchen verblieb, negativ. Dasselbe negative Resultat haben bei Kaninchen französische Forscher gehabt (Calmette und Guérin. 1901). Wenn ich sobald davon abgestanden bin, diesen Weg weiter zu begehen, so haben mich dazu sehr einfache theoretische Erwägungen verleitet. Ich bin nicht der Ansicht, daß nur durch Phagocytose ein Absterben von Keimen im lebenden Organismus eintreten kann. Ich glaube vielmehr, daß auch durch Sekretion von seiten der Leukocyten und vielleicht noch anderer Zellen bakterientötende Sub-

1) Metschnikoff, Immunität. p. 451/52.

stanzen in die Körpersäfte übergehen und daß durch diese in der Mehrzahl die Frage entschieden wird, ob der Krankheitskeim haften, sich vermehren kann oder nicht. Das Kollodiumsäckchen schützt gewiß vor Phagocyten; es schützt nicht vor den durch Diffusion in das Innere des Säckchens gelangenden, in den Körpersäften in Lösung vorhandenen Stoffen, auf deren Bedeutung und Herkunft ich noch weiter unten zurückzukommen genötigt bin. Der Kern des Problems wird durch das Kollodiumsäckchen nicht getroffen.

Dazu kommt, daß für meinen Fall die Methode gewisse, nicht gerade unüberwindbare, aber immerhin unangenehme Schwierigkeiten mit sich führte, die hauptsächlich in der Erschwerung der täglichen oder noch öfteren Untersuchung des Inhalts des Säckchens durch das Mikroskop und durch Impfung auf das Kalb bestand. Es hätte für jeden einzelnen Versuch eine beträchtlichere Anzahl von Tieren herangezogen werden müssen. Dazu kam die stetige Gefahr der Infektion der Bauchhöhle von dem Darm aus oder bei den Manipulationen der Impfung, kurz, ich habe mich nicht veranlaßt gesehen, auf die Methode noch einmal zurückzugreifen, zumal ich der Ansicht war, daß alle diese Schwierigkeiten auf andere Weise umgangen werden könnten.

Für eine überzeugendere Klarlegung der unbekannteren Aetiologie der Vaccine schien es notwendig, eine Methode zu finden, die die Vermehrung des Vaccinekeimes außerhalb eines geschlossenen Zellsystems, ja womöglich außerhalb der eigentlichen Körperzellen gestattete. Wenn auch die Entwicklung, die mutmaßlich vorhanden war, nicht ganz außerhalb aller körperlichen Elemente abzulaufen brauchte, so mußte doch in einem oder in mehreren Momenten eine beträchtliche Anzahl sichtbarer oder unsichtbarer körperfremder Gebilde außerhalb der Körperzellen sich nachweisen lassen. Wenn es gelang, mit solchen tierischen Flüssigkeiten echte Pocken bei Kälbern zu erzeugen zu einer Zeit, wo die übergeimpften Pockenkeime nach Kontrollversuchen sicher verschwunden waren, oder in solcher Verdünnung, daß die Wirkung der Pockenerzeugung nicht auf die ursprünglich übergeimpften Erreger zurückzuführen war — so war nach meiner Ansicht nicht nur ein neuer Weg für die Beantwortung der Frage eröffnet, was für Elemente die Ursache der Vaccine seien; es war damit meines Erachtens auch eine Methode gegeben, mit der es mutatis mutandis gelingen mußte, die noch unbekannteren Erreger der Masern, des Scharlachs, der Syphilis und vielleicht noch anderer Infektionskrankheiten in ähnlicher Weise zur Vermehrung zu bringen, d. h. zu züchten, wenn man so will, auch in „Reinkulturen“. Und es war möglich, alle diejenigen Untersuchungen mit dem betreffenden Material anzustellen, welche der heutigen Stand der parasitologischen Wissenschaft nahe legt. Ein so exakter Beweis, wie ihn die Möglichkeit der Züchtung auf künstlichem Nährboden zu liefern erlaubt haben würde, lag dann freilich nicht vor. Aber es schien, daß man berechtigt sei, sich mit dem eben Aufgezählten zu begnügen, zumal ja bei einer Reihe als Krankheitserreger anerkannter Parasiten, z. B. den Hämamöben der Malaria, von einer Vollständigkeit, wie ich sie für den Nachweis des Pockenerregers erstrebte, noch heute in einigen Punkten abgesehen wird.

Wenn tierische Säfte als Nährflüssigkeit für die Vermehrung der Parasiten dienen sollten, so mußte zunächst die Frage beantwortet werden, ob nicht die Flüssigkeit als solche ungeeignet erscheint, ob die

Parasiten nicht eben Zellschmarotzer sind, die nur im Inneren von Zellen die Bedingungen ihrer Entwicklung finden. Es ist ohne weiteres zuzugeben, daß der letztere Punkt allein der entscheidende sein kann; daß also die Vaccinekeime sich nur innerhalb lebender Epidermiszellen zu vermehren vermögen. In diesem Falle sind alle unsere weiteren Bemühungen überflüssig. — Es kann weiter die Sachlage derart sein, daß die Vaccineerreger wenigstens des möglichst unveränderten Inhalts der Epidermiszellen zu ihrer Vermehrung bedürfen. In letzterer Beziehung darf ich an das erinnern, was ich oben über meine Mißerfolge bei Benutzung eines Nährbodens mitgeteilt habe, der aus zerriebenen Epidermiszellen des Kalbes und Kälberserum bestand. Indessen von anderer Seite liegen Beobachtungen vor, nach denen wenigstens eine begrenzte Vermehrung der Vaccinekeime in derartigen Nährböden festgestellt worden ist. Noch jüngst hat Ishigami mitgeteilt, daß ihm eine Züchtung der Vaccineerreger bis zur 3. Generation in derartigen Nährböden geglückt sei. Auch die von Freyer festgestellte Tatsache, daß man die Vaccineerreger innerhalb 3—4 Wochen nach erfolgter Impfung im Blute nachweisen kann, scheint mir gegen solchen strengen Zellparasitismus, bei dem die Parasiten ja meist an eine ganz bestimmte Art von Zellen gebunden sind, zu sprechen.

Ist es also wahrscheinlich, daß auch flüssige Nährböden an sich, wenn sie nur das richtige Nährmaterial enthalten, zur Züchtung unserer Parasiten geeignet sind, so bliebe die Notwendigkeit, nach denjenigen anderen Ursachen zu suchen, die für die ausbleibende Vermehrung der Vaccinekeime nach der 3. Generation, aber eventuell auch für ein Absterben derselben in den Säften des lebenden Organismus verantwortlich zu machen sind. Im folgenden möchte ich einer Ueberlegung Ausdruck geben, die mir geeignet erscheint, eine solche Ursache für das Aufhören der Vermehrung der Kuhpockenerreger auszuschalten.

Wenn man Versuchstieren subkutan oder in eine Körperhöhle wirksame Lymphe beibringt, wird man, wie bekannt ist, finden, daß von einer Entwicklung des Krankheitserregers keine Rede ist, daß derselbe vielmehr schon nach kurzer Zeit an der Stelle nicht mehr vorhanden ist, der er auch in größeren Mengen einverleibt wurde. Durch mehrfach wiederholte Versuche habe ich feststellen können, daß Vaccineerreger, die dem Kaninchen subkutan am Ohre beigebracht werden, sich zwar in dem nach 24 Stunden der Impfstelle entnommenen Material noch eben nachweisen lassen, übrigens nicht immer, nur in der Mehrzahl der Fälle; daß aber in dem nach 48 Stunden derselben Impfstelle entnommenen Material nur selten noch Pustelerreger vorhanden sind und daß sie am 3. und 4. Tage regelmäßig fehlen. Die Lymphe war dabei in Schwämmchen aufgesogen, die subkutan am Ohre in nachher genauer zu beschreibender Art untergebracht waren. Da mir die Möglichkeit nicht ausgeschlossen erschien, daß mit dem nach 24 und 48 Stunden aus dem Schwämmchen ausgedrückten Material eben die Gesamtheit der Parasiten entfernt sei, habe ich in einem Versuche dem geimpften Tiere erst am 3. Tage, einem zweiten geimpften Tiere erst am 4. Tage nach Einschlebung des Lympheschwämmchens zuerst etwas ausgedrückt, in Kapillaren aufgesogen und auf das Kalb verimpft. Dabei haben sich Pusteln überhaupt nicht entwickelt. Doch ist in einem der drei Kreuzschnitte, die mit dem Material vom 3. Tage geimpft waren, es an dem einen Ende eines Schnittes zu einer kleinen infiltrierten Rötung, die schließlich Stecknadelkopfgröße erreichte, gekommen.

Was ist aus den Parasiten im Subkutangewebe der Kaninchen in dieser Zeit geworden? Wir können nur annehmen, daß entweder an der Impfstelle, was bei unserer Art der Impfung wohl allein zutrifft, oder in inneren Organen eine Abtötung derselben stattgefunden hat, in ähnlicher Weise, wie Bakterien im unempfindlichen Organismus abgetötet werden. Allerdings ist das Kaninchen gewiß nicht zu den für Vaccine ganz unempfindlichen Tieren zu zählen. Darauf wird später noch einmal zurückzukommen sein. Wahrscheinlich ist die Invasionspforte bei subkutaner Impfung des Materials eine so ungunstige, daß es zu einer wirklichen Infektion des Tieres, zur ausgiebigen Vermehrung der Parasiten im Körper nicht kommen kann, sei es nun, daß die endgültige Vernichtung am Orte der Impfung oder in den inneren Organen stattfindet.

Ueber die bei dieser Vernichtung eine Rolle spielenden Faktoren wird man am besten klar sehen, wenn man die Verhältnisse kurz ins Auge faßt, die bei Abtötung der Bakterien von ausschlaggebender Bedeutung sind. Toxische Wirkungen der unbekanntem Infektionserreger, derart, wie wir sie beim Diphtherie- und Tetanusbacillus, beim *Bac. botulinus* kennen, auch etwaige die Toxizität paralysierende Antitoxine des Blutes sind uns ja bisher nicht bekannt geworden. Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß dieselben Gewalten, welche die Ursache der Baktericidie des Organismus sind, auch bei der Abtötung der unbekanntem Infektionsstoffe mitwirken. Zur Bekräftigung dieser Behauptung genügt es, auf die Arbeiten von Bécîère, Chambon und Ménard in den Annales Pasteur. 1896, 1898, 1899 hinzuweisen. Die Autoren haben unter anderem gezeigt, daß das Blutserum von Färsen, Pferden und das des Menschen, falls dieselben die Vaccine- oder Variolaimpfung überstanden haben, nach etwas verschieden langer Zeit „virulicide“, d. h. das Virus der Vaccine bzw. Variola auch in vitro abtötende Eigenschaften erhält.

Bezüglich der Abtötung von Bakterien nun im lebenden Körper darf man wohl das Folgende als von fast allen Seiten anerkannt betrachten: Es sind, wenn wir hier von der Phagocytose absehen, in den Säften des Körpers antiparasitäre Substanzen gelöst vorhanden oder sie erscheinen im Momente der Infektion, über deren Natur wir im Laufe der Zeit gewisse Aufschlüsse erlangt haben. Die eine Komponente dieser Substanzen wird durch Erhitzen auf 55—60° C während einer halben Stunde zerstört, ebenso durch starke Verdünnung mit Wasser, durch mehrtägiges Stehen bei 37° C, durch mehrwöchentliches bei Zimmertemperatur. Die Ausfällung dieser Substanz gelingt nicht mit absolutem Alkohol, wohl aber mit konzentrierteren Salzlösungen (Natriumsulfat). Die zweite Komponente ist wesentlich beständiger gegenüber der Erwärmung und Verdünnung, sie hält sich über Jahre unverändert oder nur wenig abgeschwächt. Beide sind den Eiweißkörpern nahestehende, kompliziert gebaute Substanzen, über deren chemische Konstitution wir noch so gut wie gar nichts wissen. Nennen wir diese Substanzen (mit Ehrlich) die erste Komponente Komplement und die zweite Zwischenkörper oder Ambozeptor. Auf die übrigen im Laufe der letzten Jahre festgestellten Details hinsichtlich dieser Substanzen braucht an dieser Stelle nicht weiter eingegangen zu werden, was um so erfreulicher ist, als der Streit der Meinungen über diese Details noch fast täglich in den Spalten aller Zeitschriften tobt.

Uns interessiert hier zunächst die Frage nach der Herkunft dieser

Substanzen, über die glücklicherweise ebenfalls eine gewisse Einigkeit erzielt ist. Es dürfte kaum Widerspruch hervorrufen, wenn eine gewisse Verwandtschaft derselben mit den Nukleinen, den Kernsubstanzen der Körperzellen behauptet wird und man sie als Sekretionsprodukte kernhaltiger Zellen, die natürlich auch bei dem Zerfall von Zellen und deren Kernen frei werden, ansieht. Diejenigen Zellen, welche hauptsächlich zur Anreicherung von antiparasitären Stoffen im Blute beitragen, sind zweifellos die weißen Blutkörperchen der verschiedensten Art. Ist doch nicht nur erwiesen, daß einerseits Hyperleukocytose und Vermehrung der Baktericide, andererseits Hypoleukocytose und Verminderung derselben meist Hand in Hand gehen; man hat auch durch Abtötung der Leukocyten, z. B. durch Gefrierenlassen von Exsudaten, eine Vermehrung der baktericiden Wirkung derselben, durch Erwärmung der Leukocytensekrete auf 60° eine völlige Aufhebung der baktericiden Wirkung erzielt. Wenn auch die Leukocyten vielleicht nicht die einzigen Produzenten der baktericiden Substanzen sind, einen beträchtlichen Anteil an der Erzeugung derselben werden wir ihnen gewiß zusprechen dürfen.

Auch für die Abtötung der in den Kaninchenkörper durch künstliche Impfung eingeführten Vaccineerreger, wahrscheinlich auch für die ausbleibende Vermehrung in späteren Generationen künstlichen Nährmaterials, das ja fast immer zum Teil wenigstens aus Blutsrum oder verwandten Stoffen bestand, wird man die in den normalen Körpersäften fertig vorhandenen „viruliciden“ oder „parasiticiden“ Substanzen in erster Linie verantwortlich machen. Wenn man im stande wäre, diese Substanzen auszuschalten, würde vielleicht eine Entwicklung der Krankheitserreger im Tierkörper, sowie vielleicht auch auf künstlichem Substrat zu erreichen sein. Es lag also nahe genug, den Versuch zu machen, zunächst einmal dem tierischen Organismus die Fähigkeit der Abtötung der Vaccineerreger durch antiparasitäre Substanzen zu nehmen. Und es erschien von vornherein weit leichter, besonders bei dem heutigen Stande unserer Kenntnisse, einem Organismus eine natürliche Widerstandsfähigkeit zu rauben, als etwa einem disponierten Körper Schutz gegen eine bestimmte Erkrankung zu verleihen.

Die folgende Besprechung beschäftigt sich nur mit der Entwicklung im lebenden Tierkörper, gar nicht mit der Vermehrung auf totem Substrat.

Durch Erzeugung einer Hypoleukocytose, durch Schwächung des Körpers mit Blutentziehungen oder durch schlechte Ernährung, auch durch Ueberanstrengungen oder Erschwerung der Wärmeregulation; ferner durch Bindung eines Teiles der antiparasitären Substanzen vermittelst chemischer Gifte oder anderer Körper organischer Art (Chloral, Aleuronat) oder vermittelst Bakterien oder Bakterientoxine (Diphtheriegift) ist man in der Lage, eine erhöhte Disposition für einzelne Infektionen herbeizuführen. Vielleicht würde auch eine Erhöhung der Disposition für Vaccine bei Versuchstieren auf einem dieser Wege oder durch Kombination einiger derselben zu erreichen sein.

Aussichtsreicher und dem Stande unserer Kenntnisse mehr entsprechend erschien es, den Versuch zu machen, die parasiticiden Substanzen direkt anzugreifen bezw. zu binden dadurch, daß man mit der Lymphe zugleich Antikörper der die Erreger abtötenden Substanzen einverleibte. Wie es gelungen ist, Antihämolyse zu erzeugen, die die Wirkung der Blutgifte aufzuheben vermögen, so konnte es auch möglich

sein, antiparasiticide Substanzen zu gewinnen, die zusammen mit der Lymphe dem Tierkörper einverleibt, die Wirkung der in den Körpersäften vorhandenen Parasitolytine aufhoben und damit den Vaccinekeimen eine ausgiebige Vermehrung ermöglichten. Dabei konnte man Antikörper und Lymphe entweder gleichmäßig im ganzen Körper verteilen oder beide an einer Stelle subkutan fixieren. Letzteres erschien besseren Erfolg zu versprechen, weil es leichter sein mußte, die supponierten „Lysine“ lokal als im ganzen Körper zu binden. Nach Ehrlichs Auseinandersetzungen sind theoretisch als Antihämolysine drei verschiedene Antikörper denkbar, da drei angreifbare haptophore Gruppen vorhanden sind, zwei am Ambozeptor und eine am Komplement. Demnach können Antihämolysine entweder Antiambozeptoren oder Antikomplemente sein. Außer bei Hämolysinen sind Antiambozeptoren auch gegen Choleraambozeptoren von Pfeiffer und Friedberger erzeugt worden. Daraus schöpfte ich die Hoffnung, diese Verhältnisse auch auf unseren Fall übertragen zu können, obgleich wir vorläufig nicht wissen, ob auch die virulicide Wirkung des Serums der vaccineimmunen Kälber eine komplexe ist, d. h. auf Vorhandensein von Ambozeptor und Komplement beruht. Eine Tatsache scheint direkt gegen letztere Annahme zu sprechen; die nämlich, daß die virulicide Wirkung des fraglichen Serums selbst durch halbstündiges Erhitzen auf 100° nicht aufgehoben wird. Einmal aber handelt es sich dabei um getrocknetes Serum und zweitens wissen wir, daß es auch Komplemente von größerer Wärmebeständigkeit gibt. Ehrlich und Morgenroth haben z. B. im Ziegen Serum ein bei 56° nicht zerstörtes Komplement gefunden. Es wäre also durch besondere Versuche erst festzustellen, ob vielleicht das Komplement des viruliciden Serums eine sehr hohe Thermostabilität besitzt. Jedenfalls konnte diese Ueberlegung nicht hindern, die bei den Hämolysinen und den baktericiden Substanzen festgestellten Verhältnisse als im großen und ganzen auch für die Vaccineimmunität gültig anzunehmen.

Will man also Antiambozeptoren oder Antikomplemente für unsere Bedingungen immunisatorisch erzeugen, so ist es notwendig, sich über die Bildung der Ambozeptoren und der Komplemente des normalen Serums klar zu werden. Als Bildungsstätte der Cholera- und Typhusambozeptoren kennen wir die hämatopoetischen Organe, Knochenmark, Milz, Lymphdrüsen. Die hämatopoetischen Organe werden auch für unseren Fall als Ambozeptorenbildner hauptsächlich in Betracht kommen. Indes herrscht bereits über die Hinzurechnung der Milz keineswegs Einigkeit. Von vielen Seiten wird die Milz als hämatopoetisches Organ sehr niedrig eingeschätzt. Nach Ehrlich „kann die Bedeutung der Milz für die Produktion der weißen Blutkörperchen keineswegs erheblich sein; wenn wirklich Zellen von ihr produziert werden, müssen dies körnchenfreie sein. Die Milz steht somit in ihrer Funktion in engerer Beziehung zum Lymphdrüsen system als zum Knochenmark. Sicherlich hat die Milz zu der gewöhnlichen Leukocytose nicht die geringste Beziehung“. Die Eigenschaft der Milz als Trümmerstätte der verschiedenen Blutkörperchen empfiehlt immerhin, auch mit diesem Organ wenigstens einmal einen Versuch zu machen. Daß rote Blutkörperchen von der Milz aufgenommen werden und daß eine Hämolysie derselben vielleicht mit die wichtigste Funktion der Milz darstellt, ist lange bekannt und neuerdings durch Jawein wieder ausdrücklich betont worden; aber auch die Zerfallsprodukte der weißen Blutkörperchen werden nach

Ehrlich von dem Milzparenchym aufgenommen. Deshalb lohnte es sich also vielleicht doch, auch die Milz zu den Versuchen, Antiambozeptoren zu erzeugen, mit heranzuziehen.

Die Komplemente sind Zellsekrete, die gewiß zum Teil von den Leukocyten stammen. Man konnte also versuchen, mit den Leukocyten der zur Züchtung des Vaccineerregers dienenden Tierespezies bei anderen Tieren Antikomplemente zu erzeugen, wie das schon verschiedenen Autoren (Wassermann, Ascoli und Riva) gelungen ist. Leukocyten kann man gerade von Kaninchen leicht genug erhalten. Durch Weizenkleber, durch sterile Bakterientoxine, durch Glutenkasein, Papayotinlösung, zimmtsaures Natron kann man genügende Mengen in irgend einer Körperhöhle des Kaninchens ansammeln und leicht steril gewinnen. Wenn ich trotzdem nicht die Leukocyten selbst zur Immunisierung der serumliefernden Tiere benutzt habe, so geschah das aus folgenden Gründen: Erstens wird wahrscheinlich ein Teil der freien Seitenketten der weißen Blutkörperchen durch die die Chemotaxis hervorrufende Substanz gebunden und dieselben kommen also in dem Körper des zu behandelnden Tieres nicht zur Wirkung, zur Erzeugung der betreffenden Antikomplemente. Handelte es sich dabei gerade um Rezeptoren, die mit den parasiticiden nahe verwandt oder identisch sind, so wird die beabsichtigte Wirkung des Serums, welches die Antikomplemente dem Kaninchenkörper zuführen soll, ausbleiben müssen. Zweitens wissen wir ja vorläufig nicht, welche Art von Leukocyten die für Vaccineerreger parasiticide Substanz, das wirksame Komplement erzeugen; es wäre möglich, daß diejenigen, welche durch Aleuronat bezw. die anderen oben genannten Stoffe angelockt werden, ganz andere sind als die, welche die für die Erreger der Vaccine parasiticide Stoffe sezernieren. Nach Ehrlich werden durch Parasiten nur die polymorphkernigen weißen Blutkörperchen positiv chemotaktisch beeinflußt, den anderen weißen Blutkörperchen, wenigstens soweit sie aus Lymphdrüsen stammen, wird die Fähigkeit, auf Parasiteneinwanderung durch positive Chemotaxis zu reagieren, völlig abgesprochen. In ähnlicher Weise faßt auch Denys die Sachlage auf. Im Gegensatz dazu gibt Metschnikoff an, daß körperliche Elemente und Gebilde tierischer Herkunft durch die Makrocyten, die großen einkernigen Zellen verdaut werden, daß sie nur durch „Makrocytase“ zu Grunde gehen; während bakterielle Eindringlinge durch die Mikrocytase der polymorphkernigen Leukocyten vernichtet würden. Metschnikoff ist nun allerdings der Ansicht, daß die Erreger der Pocken zu den kleinsten pflanzlichen Gebilden gehören, die wir eben ihrer Kleinheit wegen niemals sehen können; nach ihm würden dieselben also doch durch die Mikrocyten vernichtet werden, wodurch also wieder zur Immunisierung nur polymorphkernige Leukocyten in Betracht kämen. Vorläufig war indessen ein definitiver Beweis für die Berechtigung der Auffassung Metschnikoffs betreffend die Qualität der Pockenerreger nicht erbracht, wenn mir auch diese Auffassung sehr wahrscheinlich war. Es bestand immerhin wegen der Möglichkeit, daß es sich auch um tierische Parasiten handeln könnte, die Verpflichtung, mit Makrocyten zu immunisieren.

Um letztere zu erhalten, mußte man sich schon der sie produzierenden Organe bemächtigen und es kam also darauf an, Lymphdrüsen zur Immunisierung zu verwenden. Dann aber lag es nahe, sich auch des die polymorphkernigen Leukocyten erzeugenden Organes zur Produktion der Antimikrocytase zu bedienen. Lymphdrüsen und Knochenmark sind

also zur immunisatorischen Erzeugung von Antikomplementen benutzt worden.

Gegen die Verwendung von Leukocyten und leukocyten erzeugenden Organen allein zur Gewinnung von Antikomplementen ließ sich aber noch ein dritter Grund anführen. Es ist sehr fraglich, ob Leukocyten die einzigen Produzenten von Komplement sind; wahrscheinlich ist vielmehr, daß sie eben nur eine Quelle des Verdauungsfermentes sind. Warum sollte es nicht noch andere geben? Warum sollten nicht auch andere Körperzellen, vor allem auch fixe Gewebszellen, derartige Substanzen erzeugen? Will man einigermaßen sicher sein, die Gesamtheit der in einem Serum vorhandenen Komplemente zur Gewinnung entsprechender Antikomplemente zu verwenden, so ist es jedenfalls am einfachsten, das frische Serum selbst zur Immunisierung anderer Tierpezies zu benutzen. Uebrigens nicht einmal nur das frische Serum! Sind doch auch Komplementoide zur Erzeugung von Antikomplementen geeignet!

Milz, Knochenmark, Lymphdrüsen und das Serum der zur Züchtung der Vaccineerreger zu verwendenden Tierpezies waren also zur Impfung anderer Tierarten heranzuziehen. Es mußte nun erwünscht erscheinen, möglichst nicht nur eine Tierart mit diesen Substanzen zu behandeln, sondern mehrere, im System möglichst getrennt stehende. Durch die schönen Untersuchungen Ehrlichs und seiner Mitarbeiter scheint mir die Vielheit der Ambozeptoren und Komplemente des normalen Serums mit voller Sicherheit erwiesen. Da es möglich war, daß die zur Abtötung der Vaccineerreger dienenden Ambozeptoren und Komplemente des „Züchtungstieres“ gerade bei der einen, eventuell allein zur Immunisierung herangezogenen Tierart keine Rezeptoren fanden, so mußten schon aus diesem Grunde möglichst mehrere Spezies immunisiert werden.

Die verschiedenen auf dem Immunisierungswege erhaltenen Sera konnten zunächst allein für sich auf ihre antiparasiticide Wirkung geprüft werden; es war aber auch nötig, Kombinationen zu prüfen, einmal derart, daß die Sera verschiedener mit dem gleichen Organ etc. immunisierter Tierarten miteinander vermischt wurden; zweitens Kombinationen von Antiambozeptoren mit Antikomplementen vorzunehmen.

Die Vielheit der Ambozeptoren und Komplemente des normalen Serums, die Wahrscheinlichkeit, daß bis zu einem gewissen Grade auch eine Stellvertretung derselben untereinander stattfindet, die hieraus resultierende Schwierigkeit, vollwirksame Antiambozeptoren oder Antikomplemente bezw. beides zu erhalten, ließen wünschen, daß es möglich sein möchte, durch irgend ein Verfahren gerade diejenigen Substanzen unter der Vielheit der vorhandenen zu fassen, welche den Vaccinekeim in den Säften des Körpers vernichten. Am sichersten und zugleich leichtesten mußte das dadurch zu erreichen sein, daß man nicht das Serum und die Organe normaler Tiere, sondern solcher, die die Infektion mit Vaccine überstanden haben, verwendete. In dem Blutserum solcher sind an sich, wie ja Béclère, Chambon und Ménard für zwei Tierarten nachgewiesen haben, etwa vom 14. Tage nach der Impfung an gerade diejenigen Stoffe angereichert, welche den Erreger der Kalbspusteln vernichten. Auch über die Entwicklung der Vaccineimmunität bei Kaninchen sind wir durch die Untersuchungen von Calmette und Guérin unterrichtet (A. P. 1901). Danach tritt bei diesen Tieren nach der Hautimpfung und nach subkutaner Impfung

der Lymphe die Schutzkraft des Blutes am 6. Tage ein, nach der intravenösen Impfung schon am 5. Tage.

Bringt man solches Immunserum mit Lymphe zusammen, so ist schon nach wenigen Minuten die Gesamtheit der in der Lymphe vorhandenen Keime vernichtet, wie man durch Abzentrifugieren der Lymphebestandteile und Verimpfung derselben auf das Kalb erweisen kann. Ob auch in der Milz, dem Knochenmark, den Lymphdrüsen derartiger Tiere spezifische „virulicide“ Stoffe sich bilden, ist wohl noch nicht bekannt, erscheint aber nach unseren Kenntnissen über die Bildung baktericider Stoffe jedenfalls sehr wahrscheinlich.

Es war also empfehlenswert, neben den Organen und dem Serum normaler auch dieselben Stoffe mit Vaccine etwa 8 Tage vorher geimpfter Tiere zur Immunisierung einer Anzahl von Tierarten zu verwenden. Es mußte sich zeigen, ob bei den so behandelten Tieren nur eine entsprechende Verdünnung von „viruliciden“ Stoffen sich im Körper fand oder ob diese viruliciden Stoffe im stande waren, Antikörper zu erzeugen, die dann natürlich im höchsten Maße die Fähigkeit besitzen mußten, die Abtötung der Vaccinekeime im Körper des Züchtungstieres zu verhindern.

Aus allem bis jetzt Ausgeführten geht hervor, von welcher Bedeutung die richtige Auswahl des Züchtungstieres für den Ausfall der ganzen Untersuchung sein mußte. Da die Gesamtheit der resultierenden Immunsera zugeschnitten war auf diese Tierspezies, die zur Züchtung des Vaccinekeimes dienen sollte, so konnten nicht beliebige andere Tierarten nachher zur Züchtung verwendet werden. Wissen wir doch, daß solche Sera immer am kräftigsten, zuweilen sogar ausschließlich auf die derselben Tierspezies angehörenden Zellen bezw. Lösungen wirken. Wie aus dem Vorstehenden schon ersichtlich ist, habe ich als Züchtungstier das Kaninchen erwählt, und zwar aus folgenden Gründen: Einmal sind die Tiere jederzeit leicht zu beschaffen. Dann kann man beträchtlichere Mengen Blut von ihnen erhalten, als von ganz kleinen Tieren. Die in Betracht kommenden Organe sind von einigem Volum und in ihrer Zusammensetzung hinsichtlich der in ihnen vorkommenden Arten von Leukocyten genau erforscht. Und schließlich ist das Kaninchen zu denjenigen kleineren Laboratoriumstieren zu rechnen, die als empfänglich für Vaccine gelten müssen; d. h. es ist anzunehmen, daß die Körpersäfte desselben den Vaccineerregern als Nährmaterial dienen können. In letzterer Hinsicht betone ich die Tatsache, daß die Hornhautimpfungen Guarnieris und seiner Nachfolger bei Kaninchen ausgeführt sind; ich führe an, daß Hückel ein besonderes Kapitel seiner schönen Arbeit der Frage nach der Empfänglichkeit des Kaninchens für Vaccine gewidmet und festgestellt hat, daß man an den Nüstern derselben jederzeit Pockenbläschen erzeugen kann. Ich erwähne ferner, daß nach einer Arbeit von Calmette und Guérin (A. P. 1901) Kaninchen, deren Haut man am Rücken rasiert und nur mit wirksamer Lymphe bestreicht, üppige Pusteln aufgehen lassen. Ein weiterer, eigentlich nicht hierhergehöriger Grund war die von Ehrlich festgestellte Tatsache, daß man durch intraperitoneale Einspritzung normalen Ziegenserums bei Kaninchen so leicht und schnell Antikomplemente, und zwar, wie es scheint, eine Mehrheit derselben (Autoantikomplemente) erzeugen kann.

Die Summe dieser Tatsachen ließ mir das Kaninchen als geeignetstes „Züchtungstier“ erscheinen, obgleich ich bei Nachprüfung an meinen

Tieren die Resultate von Calmette und Guérin nicht ohne weiteres bestätigen konnte. Ob man aber mit der Auswahl einer anderen Tierart nicht vielleicht schnellere und bessere Resultate erzielen würde, bleibt abzuwarten.

Die Einbringung des Krankheitserregers nun zusammen mit dem Serum geschieht in der Weise, daß beim Kaninchen subkutan am Ohre eine möglichst lange Hauttasche steril angelegt wird, in die ein steriles Schwämmchen von etwa Haselnußgröße gesteckt wird, welches sich zunächst mit der wirksamen Lymphe fast vollgesogen hat und dann mit dem auf seine „antivirulicide“ Wirkung zu prüfenden Serum beschickt wird. Die Hautwunde, bei der man Blutung nach Möglichkeit vermeidet und leicht ganz ausschließen kann, wird mit Kollodium geschlossen. Zuerst nach etwa 24 Stunden und weiter täglich oder täglich mehrmals wird durch Druck auf das Schwämmchen nach Entfernung des Kollodiums, die jedoch am besten erst nach einer gründlichen Waschung der Haut des ganzen Ohres mit Sublaminalkohol vorgenommen wird, ein möglichst kleiner Teil des Inhaltes des Schwämmchens entleert, in ein steriles Glaskapillarröhrchen aufgesogen und ein Teil des erhaltenen Materials zum hängenden Tropfen, zur Anfertigung eines gefärbten Präparates, eventuell zum Ausstrich auf Agar benutzt, ein Teil in dem zugeschlossenen Röhrchen aufgehoben. Nach der Entnahme wird wieder mit Kollodium geschlossen. Es empfiehlt sich, den Kollodiumverschluß jedesmal über die ganze Breite des Ohres sich ausdehnen zu lassen, damit durch die Zusammenziehung der unter dem Kollodium befindlichen Haut und ihrer Gefäße möglichste Blutstauung mit ihren Folgen erreicht wird. Das Schwämmchen ist zuweilen, besonders wenn in dem Impfmateriale viele Bakterien vorhanden sind oder bei unvorsichtigem Arbeiten sich später entwickeln, an einem der nächsten Tage etwas zu verlagern, am besten nach der Ohrwurzel hin tiefer hineinzuschieben, da die Haut über demselben nicht nekrotische Haut sein darf, die zudem fest mit dem Schwämmchen verwächst, sondern normal oder stärker als normal von Blut durchströmte Haut sein muß. Die sich entwickelnden Bakterien werden übrigens nur insofern stören, als durch sie eine starke positive Chemotaxis von Leukocyten erzeugt werden kann. Mit dem in den Glaskapillaren aufgehobenen Material ist auf rasierte Kalbshaut ungeimpfter Tiere abzuimpfen und damit die Feststellung, ob in dem Material Vaccinekeime vorhanden sind, auch wieviele vorhanden sind, vorzunehmen.

Bei Verimpfung von Vaccinekeimen genügt eine sechstägige Beobachtung, da vom 6. Tage an Immunität eintritt. Während dieser Zeit kann wohl der Tod der Tiere, z. B. durch Bakterienwirkung eintreten, ehe die Beobachtungsperiode zum Abschluß gekommen ist; oder es kann aus anderen Gründen, etwa weil das betreffende Ohr einmal völlig nekrotisch geworden ist, notwendig werden, das Schwämmchen zu entfernen. Man braucht dasselbe in diesem Falle nur von neuem in das Immunserum einzutauchen und einem neuen Kaninchen zu implantieren.

Inwieweit eine öfters, z. B. täglich oder täglich mehrmals wiederholte Eintragung der Schwämmchen in das Immunserum von Vorteil ist, darüber, wie über manches andere, will ich heute noch keine Mitteilung machen. Es kam mir nur darauf an, zunächst die von mir befolgte Methode mitzuteilen und zu begründen. Daß sie nicht vollkommen ist und mannigfach wird abgeändert werden können und müssen, bevor sie eine größere Brauchbarkeit erreicht haben wird, erscheint selbstverständlich.

Es darf hier nicht unterlassen werden, auf das strengste davor zu warnen, daß alles, was an neuen Formen oder etwas abweichenden Gestaltungen mit dieser Methode erzeugt wird, ohne weiteres als die Vaccineerreger oder als mit ihnen irgendwie in Zusammenhang stehend angesehen wird. Es ist a priori wahrscheinlich, daß die Immunsera, besonders solange sie noch keine höhere Wirksamkeit besitzen, als Reiz auf die hämatopoetischen Organe, vielleicht auch auf die Zellen des nächstgelegenen Gewebes einwirken und daß sich infolge dieses Reizes Dinge an der Impfstelle efinden, die Fremdkörper vortäuschen können, besonders deshalb, weil in Kontrollversuchen mit dem Serum der gleichen nicht vorbehandelten Tiere diese Gebilde ausbleiben. Den besten Schutz vor Irrtümern wird in diesen Fällen immer, abgesehen von den natürlich immer notwendigen Kontrollen durch den blinden Versuch, die oben von mir angeführte Hautimpfung des gleichen Materials (aus den Glaskapillaren) beim Kalbe gewähren. Aus dem Ausfall dieser Impfung, aus der Zahl der eventuell auftretenden Pusteln, der Art der Entwicklung derselben kann man meist eine Anzahl von Schlußfolgerungen ziehen, die den vorsichtigen Beobachter mit Sicherheit vor Enttäuschungen bewahren. Daß es auch noch andere Mittel zur Sicherung gibt, wird später genauer auszuführen sein.

Nachdruck verboten.

Sur un cas d'appendicite avec *Oxyuris vermicularis* L. et *Trichocephalus trichiurus* L.

[Laboratoire d'hygiène expérimentale et de parasitologie de l'Université de Lausanne.]

Par **Bruno Galli-Valerio.**

Avec 2 figures.

Dans l'étiologie de l'appendicite entrent en jeu différentes causes: les unes agissant comme prédisposantes, les autres comme causes directes de la maladie. Soit les unes, soit les autres, sont certainement multiples.

C'est le mérite de Mr. Metchnikoff, d'avoir fixé l'attention sur le rôle que les vers intestinaux peuvent jouer dans le développement de l'appendicite.

Suivant Mr. le Dr. Rochaz¹⁾ déjà en 1724 Santorini avait signalé la présence de vers, probablement de trichocéphales, dans l'appendice. Ensuite, plusieurs autres observateurs ont signalé dans les autopsies la présence d'ascarides, des trichocéphales etc. dans l'appendice. Mr. le Dr. Rochaz, dans le travail cité, dit aussi d'avoir trouvé dans des calculs appendiculaires des œufs d'ascaride et d'oxyure.

C'est en 1900 qu'il parut un intéressant travail de Mme. Arboré-Rally²⁾ qui décrivait un cas d'appendicite chez un enfant âgé de 10 ans guéri tout de suite après l'élimination de deux *Ascaris lumbricoides*, l'un avec les vomissements, l'autre avec les selles.

1) Revue médicale de la Suisse romande. 1894. p. 637.

2) Archives de médecine des enfants. 1900. Décembre.

L'année suivante, Mr. Girard¹⁾ communiquait à la Société de biologie, d'avoir rencontré dans l'appendice reséqué à une fillette de 8 ans, une masse formée par 2 trichocéphales, un mâle et une femelle, l'extrémité antérieure d'un desquels était enfoncée dans la muqueuse.

Mr. Metchnikoff²⁾ se basant sur ces observations et ayant souvent noté, que chez plusieurs personnes présentant des symptômes d'appendicite et chez lesquelles on trouvait dans les selles des œufs d'ascaride et de trichocéphale, l'administration d'un vermifuge amenait la guérison, affirmait que les nématodes sont la cause d'un grand nombre d'appendicites. Il considérait le rôle de ces parasites comme double; c.-a.-d.: action directe mécanique ou chimique sur l'appendice; action indirecte, par l'intermédiaire des microbes qu'ils introduisent dans la muqueuse. Tout en exposant ces idées, Mr. Metchnikoff n'a pas manqué de noter, qu'il y a certainement des appendicites qui ont une autre origine, observation sur laquelle j'insiste, parce que très souvent on a affirmé que Mr. Metchnikoff avait attribué toutes les appendicites à l'action de nématodes.

A porter un appui aux idées de Metchnikoff, sont venues quelques observations intéressantes.

Ainsi Mr. Moty³⁾ annonçait d'avoir trouvé souvent *Oxyuris vermicularis*, dans des appendices reséqués, et dans trois cas ces vers lui semblaient avoir été la cause unique de l'affection. Mr. Lannelongue à son tour⁴⁾ se prononçait à la faveur de la théorie de Metchnikoff, dans le sens que les nématodes, chargés de microbes, traumatisant la muqueuse de l'appendice, déterminent une véritable inoculation:

Mais les oppositeurs à cette théorie n'ont pas manqué: Mr. Guiart⁵⁾ tout en admettant qu'ascarides et trichocéphales peuvent inoculer sous la muqueuse de l'intestin des bactéries, considérait leur rôle comme nul dans l'appendicite, car leur présence dans cette partie de l'intestin représente une véritable rareté pathologique, chose confirmée dans la même séance par Mr. Letulle qui sur 180 appendices provenant de malades atteints d'appendicite, n'avait trouvé que 2 fois des trichocéphales.

Mr. Dziembowski⁶⁾ considérait à son tour la théorie de Mr. Metchnikoff comme erronée, se basant sur le fait que l'amélioration des eaux de boisson n'a pas fait diminuer les cas d'appendicite et que s'il a trouvé des œufs de trichocéphale dans les selles de personnes atteintes d'appendicite, il en a aussi trouvé dans celles de plusieurs individus normaux. Avant de discuter les différentes opinions, j'exposerais le résultat des observations que j'ai pu faire sur un cas intéressant d'appendicite. Je dois ce cas à mon ami et collègue Mr. Dr. Rochaz d'Orbe (cant. de Vaud) à qui s'adresse ici mes plus vifs remerciements.

Marcel P., âgé de 5 ans et demi. Il a toujours joui d'une bonne santé. Un mardi après midi, après avoir accompagné son père dans une tournée, est pris de vomissements avec douleurs et ballonnement du

1) Soc. de biologie. Séance du 2 et 9 mars 1901; Semaine médicale. 1901. p. 86 et Ann. Pasteur. 1901. p. 440.

2) Acad. de médecine. Séance du 12 mars 1901 et Semaine médicale. 1901. p. 83.

3) Acad. de médecine. Séance du 2 avril 1901 et Semaine médicale. 1901. p. 107.

4) Acad. des sciences. Séance du 30 juin 1902 et Semaine médicale. 1902. p. 227.

5) Soc. de biologie. 1901. 16 mars et Semaine médicale. 1901. p. 94.

6) Nowiny lekarskie. 1901. p. 435 et Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Ref. Bd. XXXI. p. 220.

ventre. Le jeudi suivant, on appelle le médecin, qui porte le diagnostic de péritonite suppurée par perforation de l'appendice. Un chirurgien appelé le soir du même jour, pratique deux incisions dans le but exclusif de drainer la cavité péritonéale mais sans enlever l'appendice. Le patient succombe le dimanche matin à 10 heures.

A l'autopsie on trouve du pus dans toute la cavité abdominale, intestins très ballonnés, adhérents les uns aux autres, couverts de fausses membranes puriformes. Appendice pendant dans la fosse iliaque droite, sans adhérences, mais hyperémié et présentant à environ 1 cm de son extrémité distale, une grande perforation à bords gangrénés (fig. 1).

Grâce à l'obligeance de Mr. le Dr. Rochaz, j'ai pu examiner un peu de pus de la cavité abdominale, et l'appendice. Le pus contenait

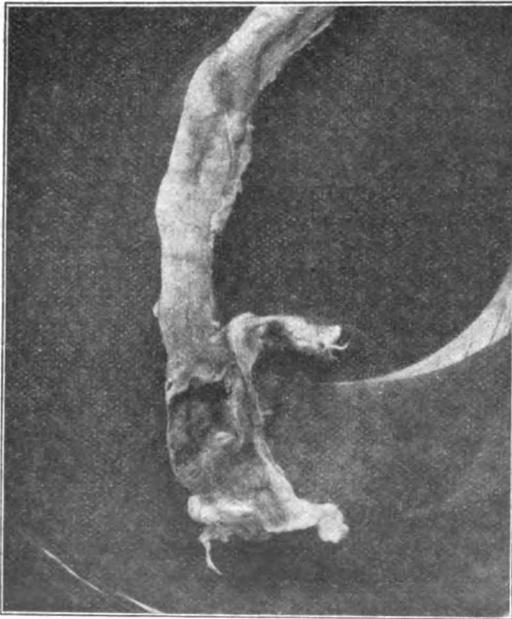


Fig. 1.

de nombreux coli-bacilles. L'appendice était rempli de matières fécales jaunâtres, molles. Dans ces matières, à œil nu, on ne remarquait rien d'anormal, mais en ayant porté une petite parcelle sous le microscope, j'y ai trouvé immédiatement des mâles d'*Oxyuris vermicularis*. J'ai alors pratiqué un grand nombre d'examen de ces matières et dans chaque préparation j'ai trouvé un ou plusieurs mâles d'oxyure, de la sorte que je me suis formé la conviction que l'appendice tout entier en était rempli. Les femelles étaient au contraire extrêmement rares. Mais à côté des oxyures, on trouvait dans quelques préparations,

des œufs caractéristiques de *Trichocephalus trichiurus*, sans qu'il fut possible de retrouver des adultes.

Je me suis servi d'un morceau de cet appendice pour pratiquer des coupes dans la paraffine, et voici quelles altérations j'ai pu constater: Les vaisseaux se présentaient partout fortement gorgés de sang, mais en général avec très peu d'infiltration inflammatoire autour de leurs parois. Par-ci, par-là, on remarquait sous l'épithélium, dans l'épaisseur de la muqueuse, des espaces semblables à des perforations, entourés d'une zone infiltrée et qui dans des coupes colorées au bleu montraient aussi des infiltrations bactériennes. Ils avaient l'air d'avoir été produites par la pénétration de nématodes, car elles étaient très analogues à celles qu'on trouve dans l'oesophage, l'estomac, l'intestin chez différentes espèces animales et qui contiennent des vers. La chose fut confirmée par

l'examen d'une coupe, où je trouvais enfilé dans l'épaisseur de la muqueuse l'extrémité postérieure d'un ♂ d'oxyure (fig. 2).

Le cas d'appendicite dont je viens de donner la description, est intéressant à plusieurs points du vue. En premier lieu, c'est un nouveau cas qui vient à s'ajouter à ceux déjà cités, où on a trouvé des nématodes dans l'appendice. Non seulement il y avait de nombreux oxyures, mais la présence d'œufs nous démontre qu'à un moment donné il y avait probablement même des trichocéphales à moins que les œufs y aient pénétré du coecum avec des matières fécales. Le fait d'avoir trouvé des lésions de la muqueuse, dans l'une desquelles existait encore l'extrémité postérieure d'un oxyure, démontre que ces vers ont joué un rôle actif dans l'appendicite, favorisant avec leurs lésions, la pénétration des

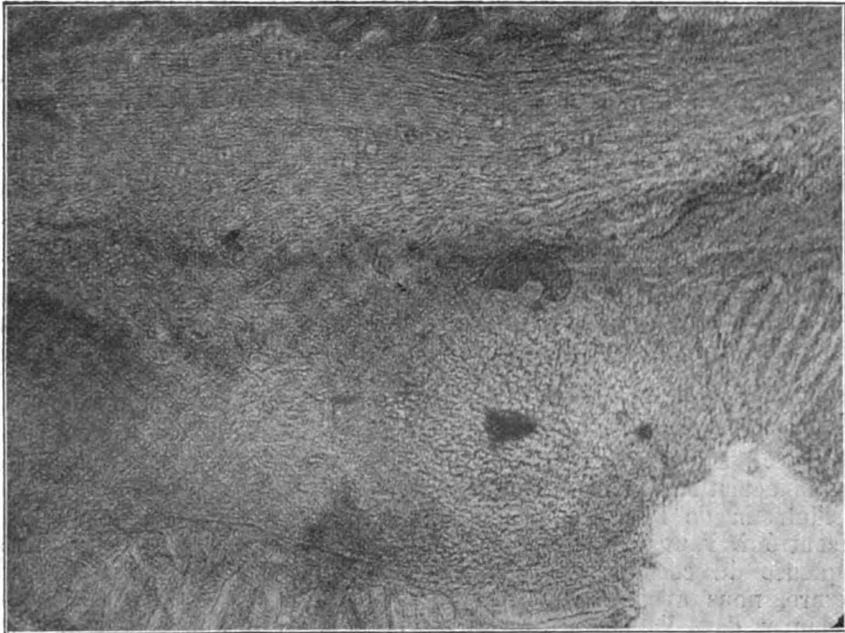


Fig. 2.

bactéries sous l'épithélium. Intéressant à noter est aussi le fait, que si je n'avais pas pratiqué l'examen microscopique des matières fécales contenues dans l'appendice j'aurais probablement considéré d'être en présence d'un cas d'appendicite sans nématodes.

Le cas que j'ai eu l'occasion d'observer exposé, il ne me reste qu'à dire deux mots des objections faites à la théorie de Mr. Metchnikoff. Mr. Guiart affirme que la présence des nématodes dans l'appendice, représente une véritable rareté pathologique. Je n'ai pas encore d'expériences pour nier ou affirmer l'affirmation de Mr. Guiart, mais que je sache on n'a pas fait de recherches systématiques à ce sujet. À moins qu'on veuille considérer comme telles, celles des observateurs qui n'ont donné qu'un coup d'œil, sans pratiquer la recherche microscopique ou du moins à la loupe.

Les recherches de Mr. Letulle, ne me semblent pas en tout cas bien probantes, car il a porté surtout son attention sur les trichocéphales et non sur les oxyures et je ne sais pas s'il a fait un examen microscopique en vu de recherches des œufs. Mon cas, en effet, démontre la nécessité de cet examen. J'ajouterai, en outre, que Mr. Moty a noté comme il faut examiner les appendices immédiatement après l'opération, sans laver à l'eau, car les oxyures en sortent déformés. J'ai noté aussi dans mon cas, qu'après passage dans l'eau et séjour de l'appendice dans le liquide de Kaiserlink, il était beaucoup plus difficile de retrouver les oxyures. Il est donc bien probable que la présence des nematodes dans l'appendice, soit plus fréquente de ce qu'on croit. Braun même observe¹⁾ que suivant quelques observateurs le siège normal des oxyures est, chez les enfants, l'appendice.

Qu'ils puissent, quand ils s'y trouvent, jouer dans certains cas un rôle important dans le développement de l'appendicite il me semble hors de doute.

Nous savons que dans les conditions normales, l'épithélium forme une excellente barrière contre la pénétration des bactéries dans la muqueuse. Il suffit sa lésion pour en permettre la pénétration. Or, il n'y a pas de doute que les helminthes puissent être des excellents agents de dissémination des bactéries dans les tissus et organes à cause de leur pouvoir de pénétration sous l'épithélium et de passer même à travers des parois très résistantes.

Mr. Piana²⁾ le premier avait noté que les migrations du *Cysticercus pisiformis* dans le foie du lapin pouvaient y entraîner des bactéries. Dans deux cas de péritonite tuberculeuse du chien associée à la présence d'*Eustrongylus gigas* dans la cavité abdominale³⁾, j'avais émis l'hypothèse, que les lésions de ce nématode avaient préparé le terrain au développement du bacille de Koch, ou bien le ver lui-même, avait dans ses migrations, porté ce bacille dans la cavité abdominale. Mr. Guiart attribue aussi un grand rôle aux nématodes dans l'inoculation des germes de la fièvre typhoïde etc. sous la muqueuse de l'intestin de l'homme, et dit que Mr. Brumpt⁴⁾ a bien souvent rencontré à l'autopsie des typhoïdes, des trichocéphales fixés dans la muqueuse du coecum. Mr. Girard pour le trichocéphale, moi pour l'oxyure, nous avons démontré que des lésions analogues peuvent se rencontrer dans l'appendice et il n'ya urait du reste aucune raison pour que cette partie de l'intestin se comporte différemment de tout le reste. Si ces faits existent, pourquoi voudrions-nous nier, que les nématodes, et surtout trichocéphales et oxyures, peuvent jouer, comme Mr. Metchnikoff l'a affirmé, un rôle important dans le développement d'un certain nombre d'appendicites? On me répondra avec Dziembowski, que les cas d'appendicite n'ont pas diminué avec la distribution d'eaux potables et qu'on trouve très souvent des œufs de nématodes chez des personnes qui ne sont pas atteintes d'appendicite.

Il me suffira de noter, que plus qu'avec les eaux, les ascarides, les trichocéphales et les oxyures peuvent être répandus par les légumes, sur lesquels, comme on sait, on trouve assez souvent les œufs de ces vers, et que si l'on trouve de ces parasites chez des individus normaux, ça

1) Die tierischen Parasiten des Menschen. III^o éd. Würzburg 1903.

2) La veterinaria. 1881.

3) Moderno zoiatro. 1896.

4) Soc. de biologie. Séance du 16 mars 1901 et Revue d'hygiène. 1901. p. 942.

ne veut absolument rien dire, car on devrait alors nier l'action pathogène du coli-bacille, du bacille de Friedländer, du bacille de la diphtérie, du pneumocoque, du bacille de Koch etc., parce que quelques-uns de ces microbes se trouvent toujours, d'autres plusieurs fois, chez des individus normaux.

Quant à l'affirmation contenue dans l'intéressant travail du Mr. Rochaz¹⁾ que les vers ne se rencontrent pas dans l'appendice pendant la vie, elle n'a plus besoin aujourd'hui d'être discutée, car nous savons qu'ils s'y trouvent très bien.

Je crois donc qu'on ne devrait pas trop oublier, en médecine, le rôle que les nématodes peuvent jouer dans le développement d'une affection si grave que l'appendicite, et à ce propos j'ajouterai qu'une sœur de l'enfant qui forme l'objet de mon travail, présentant aussi de graves symptômes d'appendicite, tant qu'elle avait été envoyée à l'hôpital, traitée par un antihelminthique, a évacué un grand nombre d'ascarides, s'est trouvée immédiatement très soulagée et tous les symptômes d'empatement de la fosse iliaque droite ont disparu comme par enchantement. Cette fillette a quitté l'hôpital guérie.

Lausanne, 8 avril 1903.

Nachdruck verboten.

Bindungsverhältnisse bei der Präzipitinreaktion.

Von Professor Dr. Frhr. von Dungern.

Das genauere Studium der Präzipitinreaktion hat uns mit einigen Erscheinungen bekannt gemacht, die auf den ersten Blick sehr seltsam erscheinen müssen. Man machte in manchen Fällen die Beobachtung, daß präzipitables Eiweiß und mit der gleichen Eiweißart dargestelltes Präzipitin ungebunden nebeneinander in der Flüssigkeit bestehen können, ohne daß es zu einer Vereinigung und Präzipitation kommt. Eine solche Lösung beider Substanzen gibt dann sowohl mit präzipitabler Substanz der gleichen Tierart wie mit zugehörigem Präzipitins serum einen Niederschlag (Linossier et Lemoine²⁾, Obermeyer und Pick³⁾, Eisenberg⁴⁾, M. Ascoli⁵⁾.) In engem Zusammenhange mit diesem Vorgange stehen auch einige andere eigentümliche Bindungsverhältnisse, welche von Eisenberg⁴⁾ durch genaue quantitative Untersuchungen mit Präzipitin festgestellt wurden und welche sich mit den Ergebnissen seiner gemeinsam mit Volk gemachten Experimente⁶⁾ über den Agglutinationsvorgang vollkommen decken. Es zeigte sich, daß eine bestimmte Menge präzipitabler Substanz mit steigendem Präzipitinzusatz immer mehr Präzipitin zu binden vermag. Die relative Absorption, d. h. das Verhältnis der absorbierten zur zugesetzten Menge wird dabei aber immer kleiner. Werden einer gleichbleibenden Dose

1) Revue méd. de la Suisse romande. 1894. p. 637.

2) Compt. rend. soc. biol. 1902. p. 87.

3) Wien. klin. Rundschau 1902. No. 15.

4) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXXI. p. 773 und Bulletin de l'Académie des sciences de Cracovie. Mai 1902.

5) Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 34.

6) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XL. 1902.

Präzipitinsersums verschiedene Mengen präzipitaler Substanz zugesetzt, so nimmt die absorbierte Menge des Präzipitins bei Vermehrung der präzipitablen Substanz zu, aber nicht proportional der zugesetzten Menge der präzipitablen Substanz, sondern in geringerem Grade. Eisenberg glaubt, daß diese Erscheinungen geeignet sind, die Präzipitinreaktion selbst und ebenso auch Einwirkungen anderer spezifischer Körper zu charakterisieren¹⁾. Er ist der Ansicht, daß die beiden reagierenden Substanzen sich trotz ihrer durch andere Versuche festgestellten hohen Affinität immer nur unvollkommen vereinigen können, so daß neben dem Reaktionsprodukt noch Ueberschüsse beider Körper frei bestehen bleiben.

Die Berechtigung dieser Schlußfolgerung wird man aber doch nur dann anerkennen können, wenn es sich bei der Vereinigung von Präzipitin und präzipitabler Substanz um einheitlich organisierte Körper handelt, welche sich nach dem bei reinen Lösungen festgestellten Massenwirkungsgesetz verbinden. Demgegenüber erhoben sich mir auf Grund meiner früheren Versuche berechtigte Zweifel. Ich habe daher zur Prüfung der genannten eigentümlichen Erscheinungen eine genaue Untersuchung vorgenommen, die zu wesentlich anderen Schlußfolgerungen führte. Dabei gelang es, einige Vorstellungen über die Konstitution der präzipitablen Eiweißkörper in Bezug auf ihre präzipitinbindenden Gruppen zu gewinnen, welche mir für die Erkenntnis der Antikörperwirkung nicht ganz unwesentlich zu sein scheinen. Die folgende Mitteilung soll darüber Auskunft geben.

Meine Versuche wurden auch diesmal an der zoologischen Station zu Neapel ausgeführt, welche sich infolge ihres Tiermaterials und ihrer zweckentsprechenden Einrichtung ganz besonders für alle möglichen biologischen Untersuchungen eignet. Der Arbeitsplatz wurde mir für die Monate Januar und Februar 1903 vom Großherzoglich Badischen Ministerium der Justiz, des Kultus und des Unterrichts, für den Monat März vom Begründer und Direktor der zoologischen Station, Geheimrat Professor Dr. Dohrn, gütigst angewiesen. Zur Darstellung und Untersuchung der präzipitierenden Sera benutzte ich, ebenso wie bei den Versuchen des vorhergehenden Jahres, die in meiner Abhandlung „Die Antikörper“ beschrieben sind²⁾, das Blutplasma von Cephalopoden (*Octopus vulgaris*, *Eledone moschata*) und von kurzschwänzigen Krebsen (*Maja squinado*, *Dromia vulgaris*). Als Versuchstiere dienten ausschließlich Kaninchen. Die quantitative Bestimmung des Gehaltes der einzelnen Blutflüssigkeiten an Präzipitin und präzipitabler Substanz geschah mit Hilfe der schon früher verwandten und beschriebenen Methode, die auch Eisenberg unabhängig von mir zu seinen Untersuchungen benutzte.

Die Vereinigung von Präzipitin und präzipitabler Substanz wurde sowohl im Reagenzglas wie im Tierkörper vorgenommen. Eine genaue quantitative Prüfung der Bindungsgesetze konnte natürlich nur durch Reagenzglasversuche erfolgen. Ich brachte zu diesem Zwecke jeweils die gleiche Menge Präzipitinsersum mit verschiedenen regelmäßig abgestuften Verdünnungen des präzipitablen Plasmas zusammen und untersuchte dann, nachdem der gebildete Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt worden war, die Flüssigkeit quantitativ sowohl auf Präzipitin

1) Aehnliche Anschauungen äußern auch Linossier et Lemoine (Compt. rend. soc. Biol. 1902. p. 87); Bordet (Ann. Inst. Pasteur. 1903. p. 164); Landsteiner und Jagić, Münch. med. Wochenschr. 1903. p. 764.

2) Jena (Gustav Fischer) 1903.

wie auf präzipitable Substanz. Es wurde jeweils eine Reihe verschiedener Verdünnungen der Flüssigkeit mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, derart, daß jede folgende immer doppelt so stark verdünnt war, wie die vorhergehende. Von jeder Verdünnung wurde dann ein Tropfen mit einem Tropfen des unverdünnten präzipitierenden Serums und ein zweiter Tropfen mit einem Tropfen des auf das 100-fache mit Kochsalzlösung verdünnten präzipitablen Plasmas versetzt. Es konnte dann nach etwa 20 Minuten durch mikroskopische Beobachtung bei 100-facher Vergrößerung leicht festgestellt werden, in welcher Weise in den verschiedenen Proben Präzipitatbildung eintrat. Ich unterschied sehr starken, starken, deutlichen, geringen, fehlenden Niederschlag; die Bezeichnung war dabei so gewählt, daß einem starken Präzipitat in der folgenden Verdünnung ein geringes entsprach, während bei einem deutlichen Niederschlag in der nächsten Verdünnung eine Präzipitatbildung nicht mehr sicher zu konstatieren war. Als Maßstab für den Gehalt der Flüssigkeit an Präzipitin oder präzipitabler Substanz benutzte ich den auf diese Weise definierten starken Niederschlag; die stärkste Verdünnung, bei welcher eine solche Präzipitatbildung noch eintrat, bezeichnete die Wertigkeit der unverdünnten Flüssigkeit in Bezug auf ihren Gehalt an Präzipitin oder präzipitabler Substanz. Es wurden dabei folgende Versuchsergebnisse konstatiert:

Tabelle I.

Versuch mit Majapräzipitinserum 9 und Majaplasma 1.

Das Serum gibt in 16-facher Verdünnung ($\frac{\text{Ser.}}{16}$) einen stark deutlichen Niederschlag.

Das Majaplasma gibt in 800-facher Verdünnung ($\frac{\text{M.P.1}}{800}$) einen starken Niederschlag.

Die einige Stunden nach der Vereinigung abzentrifugierte Flüssigkeit (F) gibt einen Niederschlag mit

		M.P.		Serum 9
		$\frac{\text{M.P.1}}{100}$		$\frac{\text{Serum 9}}{1}$
2 ccm	Serum 9 + 2 ccm	$\frac{\text{M.P.1}}{200}$	$\frac{\text{F}}{4}$ stark	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
2 "	" 9 + 2 "	$\frac{\text{M.P.1}}{100}$	$\frac{\text{F}}{2}$ stark	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
2 "	" 9 + 2 "	$\frac{\text{M.P.1}}{50}$	$\frac{\text{F}}{1}$ deutlich	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
2 "	" 9 + 2 "	$\frac{\text{M.P.1}}{24}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
2 "	" 9 + 2 "	$\frac{\text{M.P.1}}{12}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
2 "	" 9 + 2 "	$\frac{\text{M.P.1}}{6}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{32}$ stark
2 "	" 9 + 2 "	$\frac{\text{M.P.1}}{3}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{128}$ deutlich
2 "	" 9 + 2 "	$\frac{\text{M.P.1}}{1}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{512}$ deutlich

Tabelle II.

Versuch mit Majapräzipitinserum 20 und Majaplasma 2.

Das Serum gibt in 16-facher Verdünnung einen stark deutlichen Niederschlag.

Das Majaplasma gibt noch in 800-facher Verdünnung ($\frac{\text{M.P.2}}{800}$) einen starken Nieder-

schlag mit dem Serum. $\frac{M.P.2}{1}$ gibt mit $\frac{Ser.20}{1}$ noch einen sehr starken, mit $\frac{Ser.20}{4}$ dagegen nur einen starken Niederschlag. Der Niederschlag von $\frac{M.P.2}{4}$ mit $\frac{Ser.20}{4}$ ist ebenso stark wie der von $\frac{M.P.2}{1}$ und $\frac{Ser.20}{1}$.

Die einige Stunden nach der Vereinigung abzentrifugierte Flüssigkeit gibt einen Niederschlag mit

		$\frac{M.P.2}{100}$		$\frac{Ser.20}{1}$
1,5 ccm Serum 20 + 0,5 ccm	$\frac{M.P.2}{64}$:	$\frac{F}{8}$	deutlich	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „	$\frac{M.P.2}{32}$:	$\frac{F}{4}$	stark	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „	$\frac{M.P.2}{16}$:	$\frac{F}{1}$	stark	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „	$\frac{M.P.2}{8}$:	$\frac{F}{1}$	= 0	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „	$\frac{M.P.2}{4}$:	$\frac{F}{1}$	= 0	$\frac{F}{8}$ deutlich
1,5 „ „ 20 + 0,5 „	$\frac{M.P.2}{2}$:	$\frac{F}{1}$	= 0	$\frac{F}{128}$ deutlich
1,5 „ „ 20 + 0,5 „	$\frac{M.P.2}{1}$:	$\frac{F}{1}$	= 0	$\frac{F}{512}$ deutlich

(Der Niederschlag ist hier erheblich geringer als bei den übrigen Mischungen.)

Tabelle III.

Versuch mit Dromiapräzipitinserum 1 und Dromiaplasm.

Das Serum gibt mit $(\frac{D.P.}{100})$ noch in 4-facher Verdünnung $(\frac{Ser.1}{4})$ einen starken Niederschlag.

$\frac{D.P.}{512}$ gibt einen starken Niederschlag mit dem Serum.

$\frac{D.P.}{256}$ gibt schon einen makroskopischen Niederschlag.

Mit steigender Konzentration des D.P. ist der Niederschlag noch stärker, der von $\frac{D.P.}{16}$ bis $\frac{D.P.}{1}$ am stärksten.

Die eine Stunde nach der Vereinigung abzentrifugierte Flüssigkeit (F) gibt einen Niederschlag mit

		$\frac{D.P.}{100}$		$\frac{Ser.1}{1}$
1,5 ccm Serum 1 + 0,5 ccm	$\frac{D.P.}{128}$:	$\frac{F}{4}$	stark	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{64}$:	$\frac{F}{2}$	stark	$\frac{F}{1} = 0$
(1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{48}$:	$\frac{F}{2}$	deutlich	$\frac{F}{1} = 0$)
1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{32}$:	$\frac{F}{1}$	stark	$\frac{F}{1} = 0$
(1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{24}$:	$\frac{F}{1}$	= 0	$\frac{F}{1} = 0$)
1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{16}$:	$\frac{F}{1}$	= 0	$\frac{F}{1} = 0$
(1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{12}$:	$\frac{F}{1}$	= 0	$\frac{F}{1} = 0$)

1,5 ccm Serum 1 + 0,5 ccm	$\frac{D.P.}{8}:$	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$
(1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{6}:$	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$)
1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{4}:$	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{16}$ deutlich
1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{2}:$	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{64}$ deutlich
1,5 „ „ 1 + 0,5 „	$\frac{D.P.}{1}:$	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{128}$ deutlich-stark

Tabelle IV.

Versuch mit Eledonepräzipitinserum 15 und Eledoneplasma 1.

Das Serum gibt noch in 16-facher Verdünnung einen starken Niederschlag mit

$\frac{E.P.1}{100}$.

Mit $\frac{Ser. 15}{1}$ gibt E.P. noch in 4096-facher Verdünnung einen deutlichen Niederschlag. Die Stärke des Niederschlags wächst mit zunehmender Konzentration des Eledoneplasmas, $\frac{E.P.1}{1}$ bis $\frac{E.P.1}{16}$ gibt den stärksten Niederschlag.

Mit $\frac{Ser. 15}{16}$ gibt $\frac{E.P.1}{1}$, $\frac{E.P.1}{2}$, $\frac{E.P.1}{4}$ einen ganz geringen, $\frac{E.P.1}{8}$ einen deutlichen, $\frac{E.P.1}{16}$, $\frac{E.P.1}{32}$, $\frac{E.P.1}{64}$ einen starken, $\frac{E.P.1}{128}$, $\frac{E.P.1}{256}$, $\frac{E.P.1}{512}$, $\frac{E.P.1}{1024}$ einen sehr starken, $\frac{E.P.1}{2048}$ einen starken, $\frac{E.P.1}{4096}$ einen deutlichen Niederschlag.

Die Flüssigkeit (F) gibt nach einigen Stunden abzentrifugiert einen Niederschlag mit

	$\frac{E.P.1}{100}$	$\frac{Ser. 15}{1}$
1,5 ccm Serum 15 + 0,5 ccm	$\frac{E.P.}{64}:$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.}{32}:$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.}{24}:$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.}{16}:$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.}{8}:$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.}{4}:$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.}{3}:$	$\frac{F}{4}$ stark
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.}{2}:$	$\frac{F}{64}$ stark
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.}{1}:$	$\frac{F}{256}$ stark-deutlich

Tabelle V.

Versuch mit Eledonepräzipitinserum 26 und Eledoneplasma 2.

Das Serum gibt noch in 32-facher Verdünnung einen starken Niederschlag mit

$\frac{E.P.2}{100}$.

Das Eledoneplasma gibt mit $\frac{Ser. 26}{1}$ noch in 4096-facher Verdünnung einen deutlichen Niederschlag.

Die Flüssigkeit (F) gibt, einige Stunden nach der Vereinigung zentrifugiert, einen Niederschlag mit

		E.P. 2		Serum 26
		$\frac{100}{}$		$\frac{1}{}$
1,5 ccm Serum 26 + 0,5 ccm	E.P.2	$\frac{128}{}$	F stark	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 " " 26 + 0,5 "	E.P.2	$\frac{64}{}$	F deutlich	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 " " 26 + 0,5 "	E.P.2	$\frac{32}{}$	F stark	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 " " 26 + 0,5 "	E.P.2	$\frac{16}{}$	F stark	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 " " 26 + 0,5 "	E.P.2	$\frac{8}{}$	F = 0	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 " " 26 + 0,5 "	E.P.2	$\frac{4}{}$	F = 0	$\frac{F}{2}$ stark-deutlich
1,5 " " 26 + 0,5 "	E.P.2	$\frac{2}{}$	F = 0	$\frac{F}{128}$ stark

Tabelle VI.

Versuch mit Octopuspräzipitins Serum 5 und Octopusplasma 8.

Das Serum gibt noch in 16-facher Verdünnung einen starken Niederschlag mit $\frac{O.P.8}{100}$.

Das O.P.8 gibt noch in 3200-facher Verdünnung einen deutlichen Niederschlag mit dem $\frac{Ser.5}{1}$.

Die Flüssigkeit (F) gibt, einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlage abzentrifugiert, einen Niederschlag mit

		O.P.8		Ser. 5
		$\frac{100}{}$		$\frac{1}{}$
3 ccm Serum 5 + 1 ccm	O.P.8	$\frac{200}{}$	F stark	$\frac{F}{1} = 0$
3 " " 5 + 1 "	O.P.8	$\frac{100}{}$	F stark	$\frac{F}{1} = 0$
3 " " 5 + 1 "	O.P.8	$\frac{50}{}$	F gering	$\frac{F}{1} = 0$
3 " " 5 + 1 "	O.P.8	$\frac{25}{}$	F = 0	$\frac{F}{1} = 0$
3 " " 5 + 1 "	O.P.8	$\frac{12}{}$	F = 0	$\frac{F}{1} = 0$
3 " " 5 + 1 "	O.P.8	$\frac{6}{}$	F = 0	$\frac{F}{32}$ stark

Tabelle VII.

Versuch mit Octopuspräzipitins Serum 18 und Octopusplasma 11.

Das Serum gibt noch in 16-facher Verdünnung mit $\frac{O.P.11}{100}$ einen starken Niederschlag.

Das Octopusplasma gibt mit $\frac{Ser.18}{1}$ noch in 4096-facher Verdünnung einen deutlich-starken Niederschlag. Mit steigender Konzentration der präzipitablen Substanz wächst die Größe des Niederschlags zunächst, bleibt dann lange ungefähr gleich und nimmt endlich wieder ab. $\frac{O.P.11}{8}$ gibt noch maximalen Niederschlag, $\frac{O.P.11}{4}$ u. $\frac{O.P.11}{2}$ einen wenig geringeren und $\frac{O.P.11}{1}$ einen deutlich schwächeren.

Mit $\frac{\text{Ser. 18}}{4}$ gibt $\frac{\text{O.P.11}}{1}$ keinen deutlichen Niederschlag, $\frac{\text{O.P.11}}{2}$ einen deutlichen, $\frac{\text{O.P.11}}{4}$ einen starken Niederschlag.
 Mit $\frac{\text{Ser. 18}}{16}$ gibt $\frac{\text{O.P.11}}{1}$, $\frac{\text{O.P.11}}{2}$, $\frac{\text{O.P.11}}{4}$ keinen deutlichen Niederschlag, $\frac{\text{O.P.11}}{8}$ gibt einen deutlichen, $\frac{\text{O.P.11}}{16}$ einen starken, $\frac{\text{O.P.11}}{32}$ einen sehr starken, $\frac{\text{O.P.11}}{64}$ einen maximalen Niederschlag.

Die Flüssigkeit (F), einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlage abzentrifugiert, gibt einen Niederschlag mit

	O.P.11		F		F
	$\frac{100}{1}$		$\frac{100}{1}$		$\frac{100}{1}$
1,5 ccm Serum 18 + 0,5 ccm	$\frac{\text{O.P.11}}{128}$:	$\frac{\text{F}}{8}$ stark deutlich		$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.11}}{64}$:	$\frac{\text{F}}{4}$ stark		$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.11}}{32}$:	$\frac{\text{F}}{2}$ stark		$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.11}}{16}$:	$\frac{\text{F}}{1}$ stark		$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.11}}{8}$:	$\frac{\text{F}}{1} = 0$		$\frac{\text{F}}{8}$ deutlich
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.11}}{4}$:	$\frac{\text{F}}{1} = 0$		$\frac{\text{F}}{32}$ deutlich-stark
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.11}}{2}$:	$\frac{\text{F}}{1} = 0$		$\frac{\text{F}}{256}$ stark

Versuch mit Octopuspräzipitinserum 18 und Octopusplasma 12.

Das Octopusplasma gibt noch in 4096-facher Verdünnung einen starken Niederschlag mit Ser. 18.

Die Flüssigkeit (F) gibt, einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlage abzentrifugiert, einen Niederschlag mit

	O.P.12		F		F
	$\frac{100}{1}$		$\frac{100}{1}$		$\frac{100}{1}$
1,5 ccm Serum 18 + 0,5 ccm	$\frac{\text{O.P.12}}{32}$:	$\frac{\text{F}}{2}$ stark		$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.12}}{16}$:	$\frac{\text{F}}{1}$ stark		$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.12}}{8}$:	$\frac{\text{F}}{1}$ deutlich		$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 „ „ 18 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.12}}{4}$:	$\frac{\text{F}}{1} = 0$		$\frac{\text{F}}{8}$ deutlich

Tabelle VIII.

Versuch mit Octopuspräzipitinserum 7 und Octopusplasma 12.

Das Serum gibt noch in 64-facher Verdünnung einen starken Niederschlag mit $\frac{\text{O.P.12}}{100}$. Das Octopusplasma 12 gibt in 4096-facher Verdünnung einen starken Niederschlag mit Ser. 7.

Die Flüssigkeit (F) gibt, einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlage abzentrifugiert, einen Niederschlag mit

	O.P.12		F		F
	$\frac{100}{1}$		$\frac{100}{1}$		$\frac{100}{1}$
1,5 ccm Serum 7 + 0,5 ccm	$\frac{\text{O.P.12}}{256}$:	$\frac{\text{F}}{64}$ stark deutlich		$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 „ „ 7 + 0,5 „	$\frac{\text{O.P.12}}{128}$:	$\frac{\text{F}}{64}$ deutlich		$\frac{\text{F}}{1} = 0$

1,5 ccm Serum 7 + 0,5 ccm	$\frac{\text{O.P.12}}{64}$	$\frac{\text{F}}{32}$ deutlich	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 7 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{32}$	$\frac{\text{F}}{16}$ deutlich	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 7 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{16}$	$\frac{\text{F}}{4}$ deutlich	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 7 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{8}$	$\frac{\text{F}}{1}$ deutlich	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 7 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{4}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 7 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{2}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 7 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{1}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{512}$ deutlich

Tabelle IX.

Versuch mit Octopuspräzipitinserum 21 und Octopusplasma 12.

Das Serum gibt noch in 64-facher Verdünnung mit $\frac{\text{O.P.12}}{100}$ einen deutlichen Niederschlag.

Das Octopusplasma 12 gibt noch in 4096-facher Verdünnung mit $\frac{\text{Ser.21}}{1}$ einen starken Niederschlag.

Die Flüssigkeit (F), einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlag abzentrifugiert, gibt einen Niederschlag mit

	$\frac{\text{O.P.12}}{100}$	$\frac{\text{F}}{100}$	$\frac{\text{Ser.21}}{1}$
1,5 ccm Serum 21 + 0,5 ccm	$\frac{\text{O.P.12}}{128}$	$\frac{\text{F}}{16}$ deutlich	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 21 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{64}$	$\frac{\text{F}}{8}$ stark	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 21 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{32}$	$\frac{\text{F}}{8}$ deutlich	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 21 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{16}$	$\frac{\text{F}}{1}$ deutlich	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 21 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{8}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{4}$ stark
1,5 " " 21 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{4}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{16}$ stark
1,5 " " 21 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{2}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{64}$ stark-deutlich
1,5 " " 21 + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{1}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{560}$ stark

Die gleichen Reaktionen bei 4-facher Vermehrung des Flüssigkeitsvolumens.

1,5 ccm Ser. 21 + 6 ccm 1-proz. NaCl-Lös. + 0,5 ccm	$\frac{\text{O.P.12}}{128}$	$\frac{\text{F}}{4}$ stark	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 21 + 6 " 1- " " + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{32}$	$\frac{\text{F}}{2}$ stark	$\frac{\text{F}}{1} = 0$
1,5 " " 21 + 6 " 1- " " + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{8}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{1}$ stark
1,5 " " 21 + 6 " 1- " " + 0,5 "	$\frac{\text{O.P.12}}{2}$	$\frac{\text{F}}{1} = 0$	$\frac{\text{F}}{16}$ deutlich

Tabelle X.

Versuch mit Octopuspräzipitinserum 8 und Octopusplasma 5.

Das Serum gibt in 32-facher Verdünnung mit $\frac{\text{O.P.5}}{100}$ einen starken Niederschlag. Das Octopusplasma 5 gibt in 6400-facher Verdünnung mit dem $\frac{\text{Ser.8}}{1}$ oder auch mit $\frac{\text{Ser.8}}{4}$ einen deutlichen Nieder-

Die Flüssigkeit (F) gibt, einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlage abzentrifugiert, einen Niederschlag mit

	O.P.5 100	Ser. 8 1	
2 ccm Ser. 8 + (0,5 ccm $\frac{O.P.5}{100}$ + 1,5 ccm 1-proz. NaCl-Lösung):	$\frac{F}{8}$	stark $\frac{F}{1}$	= 0
2 „ „ 8 + (0,5 „ $\frac{O.P.5}{25}$ + 1,5 „ 1- „ „):	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0
(0,5 ccm Ser. 8 + 1,5 ccm 1-proz. NaCl-Lös.) + (0,5 ccm $\frac{O.P.5}{25}$ + 1,5 ccm 1-proz. NaCl-Lös.):	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{4}$	stark
Die beiden letzten Reaktionen bei 4-facher Vermehrung des Flüssigkeitsvolumens:			
2 ccm Ser. 8 + (0,5 ccm $\frac{O.P.5}{25}$ + 13,5 ccm 1-proz. NaCl-Lösung):	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0
0,5 „ „ 8 + (0,5 „ $\frac{O.P.5}{25}$ + 15 ccm 1-proz. NaCl-Lösung):	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	stark

Tabelle XI.

Versuch mit Octopuspräzipitinserum 2, Octopuspräzipitinserum 17 und Octopusplasma 13.

Serum 2 gibt noch in 16-facher Verdünnung, Serum 17 noch in 32-facher Verdünnung mit $\frac{O.P.13}{100}$ einen deutlichen Niederschlag.

Octopusplasma 13 gibt in 2048-facher Verdünnung mit $\frac{Ser. 2}{1}$ einen deutlichen, mit $\frac{Ser. 17}{1}$ einen starken Niederschlag. $\frac{O.P.13}{1}$ gibt mit Ser. 2 und Ser. 17 noch sehr starken, makroskopisch sichtbaren Niederschlag.

Die Flüssigkeit gibt, einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlage abzentrifugiert, einen Niederschlag mit

	O.P.13 100	Ser. 2 1	Ser. 17 1	
1,5 ccm Serum 2 + 0,5 ccm $\frac{O.P.13}{128}$:	$\frac{F}{8}$	stark $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0
1,5 „ „ 2 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{64}$:	$\frac{F}{8}$	deutlich $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	stark-deutl.
1,5 „ „ 2 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{32}$:	$\frac{F}{2}$	stark $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{4}$	„ „
1,5 „ „ 2 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{16}$:	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{8}$	„ „
1,5 „ „ 2 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{8}$:	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{16}$	„ „
1,5 „ „ 2 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{4}$:	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{32}$	„ „
1,5 „ „ 2 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{2}$:	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{128}$	stark-deutl.	

1,5 ccm Serum 17 + 0,5 ccm $\frac{O.P.13}{16}$:	$\frac{F}{4}$	stark $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0
1,5 „ „ 17 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{8}$:	$\frac{F}{2}$	deutlich $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0
1,5 „ „ 17 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{4}$:	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{1}$	= 0
1,5 „ „ 17 + 0,5 „ $\frac{O.P.13}{2}$:	$\frac{F}{1}$	= 0 $\frac{F}{8}$	stark $\frac{F}{8}$	stark

Wir erkennen an diesen Versuchsreihen ohne weiteres die anfangs erwähnte Erscheinung, daß die Absorption einer bestimmten Präzipitinnmenge nicht proportional der Menge der zugesetzten präzipitablen Substanz erfolgt. Wenn eine bestimmte Dose Eiweiß z. B. $\frac{3}{4}$ des Präzipitins an sich reißt und der Flüssigkeit im Niederschlage entzieht, so absorbiert die doppelte Menge Eiweiß nicht das gesamte Präzipitin, sondern weniger, z. B. $\frac{7}{8}$; erst ein höheres Multiplum der Eiweißmenge bindet das gesamte Präzipitin. Im einzelnen sind die quantitativen Verhältnisse dabei in jedem einzelnen Falle verschieden.

Da das Volumen der Flüssigkeit, in welcher sich die Reaktion abspielt, wie aus den Versuchen mit Serum 8 und Serum 21 (Tabelle 9 und 10) hervorgeht, bei den hier in Frage kommenden Verdünnungen keine nennenswerte Rolle spielt, so lassen sich die gefundenen Absorptionseffekte auch auf eine bestimmte gleichbleibende Menge präzipitabler Substanz umrechnen. Wir finden dann bei steigendem Präzipitinzusatz eine Zunahme der absoluten Absorption und eine Abnahme der relativen Absorption des Präzipitins durch die betreffende Eiweißmenge, dieselbe Gesetzmäßigkeit, welche auch Eisenberg, wie oben erwähnt, bei seinen Versuchen beobachtet hat.

Trotzdem erkennen wir aber in allen Reihen eine mittlere Zone, in der die relativen Konzentrationen von Präzipitin und präzipitabilem Eiweiß so gestaltet sind, daß beide reagierenden Substanzen sich vollkommen quantitativ vereinigen und in Form des Präzipitates ausfallen.

In Lösung bleibende Ueberschüsse beider reagierender Körper nebeneinander sind in keinem der hier untersuchten Fälle zu konstatieren¹⁾.

Im Tierkörper vollzieht sich die Vereinigung von Präzipitin und präzipitabler Substanz nicht anders als im Reagenzglase. Wenn man einem vorbehandelten Kaninchen, dessen Blut Präzipitin enthält, das zugehörige präzipitabile Eiweiß in die Zirkulation bringt, so beobachtet man wenige Minuten nach der Einspritzung je nach der Größe der injizierten Eiweißmenge eine Abnahme oder ein vollkommenes Verschwinden des Präzipitingehaltes; die eingespritzte präzipitabile Substanz wird dabei auch entsprechend ihrer Menge entweder ganz oder nur teilweise aufgebraucht. Daß auch quantitativ keine größeren Unterschiede zu verzeichnen sind, mag folgendes Beispiel zeigen:

Ein Kaninchen ist sowohl mit Majaplasma wie mit Octopusplasma vorbehandelt, sein Blut enthält soviel Majapräzipitin, daß sein Serum noch in 4-facher Verdünnung einen stark deutlichen Niederschlag mit auf das 100-fache verdünntem Majaplasma gibt und soviel Octopuspräzipitin, daß sein Serum noch in 32-facher Verdünnung mit auf das 100-fache verdünntem Octopusplasma einen deutlichen Niederschlag gibt. Es wird dem Kaninchen nun etwas Blut entnommen und dann Octopusplasma in die Ohrvene eingespritzt. Das Octopusplasma enthält soviel präzipitables Eiweiß, daß es noch in 3200-facher Verdünnung mit dem Kaninchenserum einen deutlichen Niederschlag gibt. Es wird zunächst 1 ccm Octopusplasma injiziert, darauf etwas Blut aus der Ohrvene ent-

1) Zu dem gleichen Resultate kam auch P. Müller bei der Untersuchung der Kaseinfällung durch Laktoserum, wie aus seiner nach Beendigung meiner Abhandlung in dieser Zeitschrift (Bd. XXXIV. No. 1) publizierten Arbeit hervorgeht.

nommen, dann nochmals 1 ccm Octopusplasma eingespritzt und nach wenigen Minuten wieder etwas Blut aus der Ohrvene abgelassen. Krankheitserscheinungen werden beim Kaninchen nach den Einspritzungen nicht wahrgenommen. Aus den beiden nach der Injektion von 1 ccm und von 2 ccm Octopusplasma erhaltenen Blutproben wird Serum gewonnen und dieses auf seinen Gehalt an Präzipitin und präzipitabler Substanz quantitativ untersucht. Das nach der ersten Einspritzung entnommene Serum enthält weder Octopuspräzipitin noch präzipitables Octopuseiweiß, das durch das vor der Injektion dem Kaninchen entzogene Serum nachweisbar wäre. Das auf Majaplasma einwirkende Präzipitin ist genau ebenso stark geblieben, wie vor der Einführung des Octopusplasmas. Das nach der zweiten Einspritzung von Octopusplasma entnommene Serum enthält dagegen einen Ueberschuß von präzipitabilem Octopuseiweiß, derart, daß dasselbe noch in 32-facher Verdünnung mit dem vor der ersten Einspritzung gewonnenen Serum einen deutlichen Niederschlag gibt. Ein daneben übrig gebliebener Rest von Octopuspräzipitin ist hier ebensowenig zu konstatieren, wie in der ersten Probe.

Zum Vergleiche mit den Bindungsversuchen im Kaninchenorganismus wird ein Reagenzglasversuch vorgenommen: 1 ccm des vor der Injektion gewonnenen Präzipitinserums wird mit 1 ccm des auf das 36-fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Octopusplasmas versetzt. Die nach einer halben Stunde abzentrifugierte Flüssigkeit, gibt mit Octopusplasma versetzt keinen Niederschlag, dagegen mit dem unverdünnten Präzipitinserum des Kaninchens zusammengebracht noch in 32-facher Verdünnung einen starken Niederschlag. Rechnen wir die Plasmamenge des Kaninchens, welches 2200 g wog, gleich $\frac{1}{30}$ des Körpergewichtes, so haben wir ungefähr 74 ccm Blutplasma anzunehmen. Die im Reagenzglas mit 1 ccm Serum gemischte Menge von 1 ccm $\frac{\text{O.P.}}{36}$

entspricht demnach den 2 ccm $\frac{\text{O.P.}}{1}$, welche im Tierkörper mit 74 ccm

Plasma zusammengebracht wurden. In beiden Fällen erhalten wir einen vollkommenen Verbrauch des Präzipitins und einen Ueberschuß von Octopusplasma. Im Reagenzglas ist dieser Ueberschuß etwas größer und zwar, wenn wir die durch die Versuchsanordnung gegebene stärkere Verdünnung im Reagenzglasversuch in Rechnung ziehen, mehr als doppelt so groß. Dieser verhältnismäßig geringe Unterschied bietet aber nichts Ueberraschendes, da wir im Tierkörper neben der Bindung der präzipitablen Substanz durch das Präzipitin ja auch eine solche durch Rezeptoren der Zellen anzunehmen haben. Ganz sichere quantitativ übereinstimmende Resultate wird man bei solchen Bindungsversuchen im Tierkörper freilich überhaupt nicht erwarten können, da die Berechnung der Plasmamenge nach dem Körpergewicht bei Kaninchen schon unsicher ist und vielleicht auch noch andere Momente modifizierend eingreifen können. Im wesentlichen vollzieht sich die Vereinigung von Präzipitin und präzipitabler Substanz in der Blutzirkulation aber ebenso wie im Reagenzglas.

Ob es im lebenden Blutplasma bei der Verbindung der beiden reagierenden Körper ebenso wie außerhalb des Tierkörpers zu einer Präzipitatbildung kommt, ist durch die Beobachtung nicht ohne weiteres zu konstatieren. Es liegt meines Erachtens aber kein Grund vor, daran zu zweifeln. Es ist ja wohl auffallend, das präzipitinhaltige Kaninchen, deren Präzipitin im lebenden Blute selbst durch intravenöse Injektion

einer entsprechenden präzipitablen Eiweißlösung abgesättigt wird, wie Rostowski¹⁾ und Michaelis und Oppenheimer²⁾ hervorheben, meist keine bedrohlichen Erscheinungen aufweisen, die bei der Verstopfung von Kapillaren durch Präzipitatenmassen doch zu erwarten wären. Ich habe in der Mehrzahl der Fälle auch keine Krankheitserscheinungen bei der Absättigung des Präzipitins in der Blutzirkulation beobachtet, bei einzelnen präzipitinhaltigen Kaninchen aber doch schwere Atemnot nach der Injektion des zugehörigen fremdartigen Plasmas wahrgenommen. Diese Beobachtungen sprechen also nicht vollkommen gegen die Präzipitatabildung. Im übrigen ist aber nicht ersichtlich, warum die Bedingungen für die Ausfällung der doch eingetretenen Verbindung von Präzipitin und fremdartigem Eiweiß im Plasma andere sein sollten als im Serum. Ich glaube daher nicht, daß die Präzipitation als solche im lebenden Blute unterbleibt und nehme mit Michaelis und Oppenheimer an, daß nur die Bildung gröberer Niederschläge durch Eingreifen der Phagocyten verhindert wird.

Überschüsse beider reagierenden Substanzen nebeneinander wurden auch bei den Versuchen im Kaninchenorganismus im allgemeinen nicht beobachtet. Es soll damit aber nicht gesagt werden, daß es nicht Kaninchen gibt, bei denen gleichzeitig präzipitables fremdartiges Eiweiß und Präzipitin, welches Eiweiß der gleichen fremdartigen Tierart ausfällt, gleichzeitig im Serum gelöst sind. Ich habe selbst auf diese Verhältnisse immer besonders geachtet und auch einige derartige Fälle gefunden. Es handelt sich dabei um solche Kaninchen, denen zum erstenmal eine große Menge von Octopus- oder Majaplasma in die Zirkulation gebracht wurde und die dann nach einer bestimmten Latenzperiode Präzipitin lieferten. Bei den meisten dieser Tiere verschwand das eingespritzte präzipitabile fremdartige Eiweiß schon vollkommen vor dem Auftreten des Präzipitins. Bei einigen derselben konnte aber in der ersten Zeit neben dem Präzipitin noch ein Teil der eingeführten präzipitablen Substanz nachgewiesen werden; das Serum gab dann sowohl mit der betreffenden fremdartigen Eiweißlösung wie mit dem entsprechenden Präzipitinserum eines anderen auf gleiche Weise vorbehandelten Kaninchens einen Niederschlag.

Kaninchen 18 erhält 4 ccm Majaplasma in die Ohrvene injiziert (das Majaplasma gibt in 800-facher Verdünnung einen Niederschlag mit 8-wertigem Präzipitinserum). Nach einem Tag enthält das Serum des Kaninchens so viel präzipitabile Substanz, daß es in 32-facher Verdünnung noch einen starken Niederschlag mit Präzipitinserum gibt. Nach 4 Tagen ist noch kein Präzipitin gebildet; mit Präzipitinserum gibt das Serum noch in 2-facher Verdünnung einen starken Niederschlag. Nach 5 Tagen enthält das Serum auch noch kein Präzipitin; mit Präzipitinserum bildet es dagegen noch unverdünnt einen starken Niederschlag. 6 Tage nach der Injektion ist Majapräzipitin im Serum zu konstatieren und zwar ein 2-wertiger Gehalt. Das präzipitabile Majaeiweiß ist aber trotzdem nicht verschwunden, das Serum gibt mit einem 4-wertigen Majapräzipitinserum einen starken Niederschlag. Dabei stammt dieses zum Nachweis des Majaeiweißes benutzte Präzipitin von einem Kaninchen, dem vor 5 Tagen die gleiche Menge desselben Majaplasmas in die Ohrvene injiziert wurde.

Kaninchen 16 erhält 8 ccm Octopusplasma in die Ohrvene injiziert. (Das Octopusplasma gibt in 6400-facher Verdünnung einen deutlichen Niederschlag mit 8-wertigem Präzipitinserum.) 4 Tage darauf enthält das Serum des Kaninchens Octopuspräzipitin, es gibt in 2-facher Verdünnung mit Octopusplasma (auf das 100-fache mit physiologischer

1) Verhandl. d. phys. med. Gesellsch. zu Würzburg. N. F. Bd. XXXV. 1902.

2) Arch. f. Anatomie und Physiologie. 1902.

Kochsalzlösung verdünnt) einen starken Niederschlag. Gleichzeitig ist auch noch Octopusplasma zu konstatieren, das Serum gibt unverdünnt mit dem 8-wertigen Präzipitinserum eines anderen vorbehandelten Kaninchens einen deutlichen und mit dem 8-wertigen Präzipitinserum eines weiteren Kaninchens einen starken Niederschlag.

Kaninchen 3, 1840 g schwer, erhält 6 ccm Octopusplasma in die Ohrvene eingespritzt. (Das Octopusplasma gibt noch in 6400-facher Verdünnung mit 8-wertigem Präzipitinserum einen starken Niederschlag.) Das Serum gibt, nach 3 Tagen entnommen, noch in 8-facher Verdünnung einen starken Niederschlag mit dem 16-wertigen Präzipitinserum eines anderen mit Octopusplasma vorbehandelten Kaninchens. Am folgenden Tage weist das Serum noch den gleichen Gehalt an präzipitabler Substanz auf; trotzdem enthält es jetzt auch etwas Präzipitin, es ist 1-wertig. 5 Tage nach der Injektion ist der Präzipitingehalt um mehr als das Doppelte gestiegen, die Menge der präzipitablen Substanz beträgt nur noch $\frac{1}{4}$ der früheren. 6 Tage nach der Injektion ergibt die Prüfung des Serums gar kein Octopuseiweiß mehr und einen 4-wertigen Präzipitingehalt.

Kaninchen 11 erhält 16 ccm Octopusplasma intravenös eingeführt (das Octopusplasma gibt noch in 3200-facher Verdünnung mit 8-wertigem Präzipitinserum einen deutlichen Niederschlag). Nach 3 Tagen enthält das Serum des Kaninchens noch kein Präzipitin. Nach 4 Tagen erscheint zuerst Octopuspräzipitin im Blute, das Serum gibt in 8-facher Verdünnung mit Octopusplasma (auf das 100-fache verdünnt) einen starken Niederschlag. Daneben enthält das Serum noch präzipitables Octopuseiweiß, es gibt, mit einem 32-wertigen Präzipitinserum eines anderen Kaninchens zusammengebracht, in 32-facher Verdünnung einen starken Niederschlag. Nach 5 Tagen ist der Präzipitingehalt so groß, daß man bei 32-facher Verdünnung des Serums noch einen deutlichen Niederschlag mit Octopusplasma erhält. Trotz dieses verhältnismäßig hohen Präzipitingehaltes ist auch noch Octopuseiweiß zu konstatieren und zwar ein ungefähr 16-wertiger Gehalt. Bei der Prüfung auf präzipitabile Substanz fällt es auf, daß die Wertigkeit des zur Untersuchung benutzten Präzipitinserums die Stärke der Reaktion mehr beeinflußt als dies gewöhnlich der Fall ist. 6 Tage nach der Injektion des Octopusplasmas ist keine präzipitabile Substanz mehr im Serum des Kaninchens durch Zusatz von Präzipitin nachzuweisen. Der Präzipitingehalt ist dabei der gleiche geblieben wie am vorhergehenden Tage.

Bei der Absättigung des Präzipitins in der Blutbahn durch intravenöse Injektion von Octopusplasma ist die Erscheinung des Nebeneinanderbestehens von Präzipitin und präzipitabilem Eiweiß auch bei diesem Kaninchen nicht zu konstatieren; 9 Tage nach der ersten Einführung werden aufs neue zuerst $\frac{1}{2}$ ccm und dann noch $\frac{1}{4}$ ccm Octopusplasma in die Ohrvene eingespritzt (das Octopusplasma gibt in 6400-facher Verdünnung mit dem Präzipitinserum deutlichen Niederschlag). Der Präzipitingehalt des Serums, der zu dieser Zeit 8-wertig ist, sinkt nach der ersten Injektion auf 2, nach der zweiten Injektion auf weniger als 1 Wertigkeit. Präzipitabile Substanz ist aber weder nach der ersten noch nach der zweiten Einspritzung im Serum zu finden, obgleich wieder mit dem gleichen 32-wertigen Präzipitinserum untersucht wird, mit dem beim ersten Auftreten des Präzipitins neben dem Präzipitin Octopuseiweiß konstatiert wurde.

Was nun die Erklärung dieses eigentümlichen gemeinsamen Vorkommens von ungebundenem Präzipitin und gelöster präzipitabler Substanz betrifft, so genügt schon die Inkonstanz dieser Beobachtung, um eine Zurückführung auf das Massenwirkungsgesetz auszuschließen. Die Erscheinung ist aber ohne weiteres durch ein anderes Moment zu erklären, durch die Vielheit der Präzipitine.

Ehrlich und Morgenroth¹⁾ haben gezeigt und mit Recht hervor gehoben, daß die Immunkörper, welche nach der Einführung von fremdartigen Zellbestandteilen im Organismus der Versuchstiere entstehen, nicht einheitlicher Natur sind, sondern eine Mischung mehrerer Partialimmunkörper darstellen, welche an verschiedenen chemischen Gruppen des entsprechenden Zellmaterials angreifen. Genau die gleiche komplexe Zusammensetzung muß aber auch für die Präzipitine angenommen werden. Ein bestimmtes präzipitierendes Serum eines Versuchstieres, das mit einem fremdartigen Blutplasma vorbehandelt ist, wirkt nicht durch eine einzige Art von Präzipitin auf das betreffende Blutplasma ein, sondern durch verschiedenartige präzipitierende Antikörper.

1) Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 21 u. 22.

Die Richtigkeit dieser Annahme, welche schon aus den Versuchen von M. Ascoli¹⁾ und meinen früheren Beobachtungen²⁾ hervorgeht, wird durch die folgende Untersuchung vollkommen sichergestellt. Jedes mit Plasmaeiweiß gewonnene Präzipitinserum reagiert nämlich nicht nur mit dem zur Erzeugung des Präzipitins benutzten Plasma, sondern in geringerem Grade auch mit dem Blutplasma verwandter Tierarten. So präzipitiert starkes Majapräzipitinserum auch Dromiaeiweiß. So gibt Octopuspräzipitinserum auch mit Eledoneplasma und dementsprechend Eledonepräzipitinserum auch mit Octopusplasma einen Niederschlag. Ueber die quantitativen Verhältnisse geben folgende Beobachtungen Aufschluß (p. 369).

Die mit Octopusplasma erzeugten Präzipitinsera von Kaninchen weisen demnach bei der Prüfung mit Eledoneplasma im allgemeinen $\frac{1}{4}$ oder etwas mehr als $\frac{1}{4}$, in einzelnen Fällen $\frac{1}{2}$ des Präzipitingehaltes auf, der bei der Untersuchung mit dem zugehörigen Octopusplasma konstatiert wird. Zu Beginn der Präzipitinbildung scheint der Unterschied in der Wirkung auf die beiden Eiweißarten etwas geringer zu sein als nach der Produktion des gesamten Präzipitins. Die Eledonepräzipitinsera zeigen ein entsprechendes Verhalten, sie üben auf das zugehörige Eledoneplasma eine 2–4-mal so starke Wirkung aus wie auf das nur verwandte Octopusplasma. Größer sind die individuellen Verschiedenheiten in der Qualität der Majapräzipitinsera. Ein Teil derselben präzipitiert auch Dromiaplasma und zwar ungefähr 8-mal schwächer als Majaplasma, andere bedingen dagegen, mit Dromiaplasma zusammengebracht, gar keine Niederschlagsbildung, obgleich sie in Bezug auf Majaplasma einen 8-wertigen Präzipitingehalt aufweisen. Ein Dromiapräzipitinserum ruft im Majaplasma keinen Niederschlag hervor, während es für das zugehörige Dromiaplasma fast 32-wertig ist.

Diese Erscheinungen lassen sich nun leicht dazu verwerten, unsere Voraussetzung, die Vielheit der Präzipitine in einem Serum, auf ihre Richtigkeit zu prüfen. Es müssen, wenn unsere Anschauung den Tatsachen entspricht, in jedem der untersuchten Präzipitinsera zwei verschiedene Gruppen von Teilpräzipitinen nachzuweisen sein, solche, welche nur auf das spezifisch zugehörige Eiweiß einwirken und mit dem Eiweiß der verwandten Tierart keine Reaktion geben, und daneben andere, welche sowohl das zugehörige wie auch das demselben verwandte Plasma zur Fällung bringen. Das Octopuspräzipitinserum besteht demnach aus den Teilpräzipitinen Po (nur am Octopuseiweiß angreifend) und Poe (sowohl am Octopuseiweiß wie am Eledoneeiweiß angreifend), das Eledonepräzipitinserum aus Präzipitin Pe und Präzipitin Peo, wobei Po und Pe ganz verschieden sind, Poe und Peo dagegen identisch sein können. Das Majapräzipitinserum ist ebenso aus den Partialpräzipitinen Pm und Pmd zusammengesetzt und das Dromiapräzipitinserum aus Pd und Pdm.

Der Nachweis, daß in der Tat jedes mit einem bestimmten fremdartigen Plasma erzeugte Präzipitinserum in der genannten Weise aus verschiedenen Körpern, spezifischen und nicht spezifischen, zusammengesetzt ist, kann auf zweierlei Weise durch Anwendung der Absorptionsmethode und auf dem Wege der Immunisierung geführt werden.

Beim Absorptionsversuch wird das betreffende Präzipitinserum, dessen

1) Münch. med. Wochenschr. 1902. No 34.

2) Die Antikörper. p. 79. Jena 1903.

Octopuspräzipitins serum gibt Niederschlag	mit $\frac{O.P.}{100}$	mit $\frac{E.P.}{100}$
Serum 7a	$\frac{1}{32}$ deutlich	$\frac{1}{8}$ stark
„ 7b (nach Abfall des ursprüngl. Präzipitingehaltes)	$\frac{1}{16}$ gering $\frac{1}{16}$ deutlich	$\frac{1}{4}$ deutlich
„ 4a	$\frac{1}{16}$ stark	$\frac{1}{4}$ stark
„ 4b (nach Abfall des ursprüngl. Präzipitingehaltes)	$\frac{1}{4}$ deutlich	$\frac{1}{1}$ stark
„ 6	$\frac{1}{16}$ stark	$\frac{1}{4}$ stark
„ 9a	$\frac{1}{2}$ stark	$\frac{1}{1} = 0$
„ 9b (nach weiterer Präzipitinproduktion)	$\frac{1}{8}$ deutlich	$\frac{1}{2}$ stark
„ 11	$\frac{1}{8}$ stark	$\frac{1}{2}$ stark
„ 12a	$\frac{1}{8}$ stark	$\frac{1}{4}$ stark
„ 12b (nach weiterer Präzipitinbildung)	$\frac{1}{64}$ deutlich	$\frac{1}{16}$ deutlich
„ 13	$\frac{1}{16}$ stark $\frac{1}{16}$ deutlich	$\frac{1}{8}$ deutlich
„ 16	$\frac{1}{8}$ stark	$\frac{1}{2}$ stark
„ 17a	$\frac{1}{4}$ stark $\frac{1}{4}$ deutlich	$\frac{1}{2}$ stark $\frac{1}{2}$ deutlich
„ 17b (nach neuer Injektion von O.P.)	$\frac{1}{8}$ stark	$\frac{1}{2}$ stark
„ 17c (nach weiterer Präzipitinbildung)	$\frac{1}{32}$ stark	$\frac{1}{8}$ stark
„ 18a	$\frac{1}{2}$ stark	$\frac{1}{1}$ deutlich
„ 18b (nach neuer Injektion von O.P.)	$\frac{1}{8}$ stark	$\frac{1}{2}$ stark
„ 18c (nach weiterer Präzipitinbildung)	$\frac{1}{64}$ stark $\frac{1}{64}$ deutlich	$\frac{1}{16}$ deutlich
„ 18d (nach Abfall des Präzipitingehaltes)	$\frac{1}{16}$ stark	$\frac{1}{8}$ stark $\frac{1}{8}$ deutlich
„ 8	$\frac{1}{32}$ stark	$\frac{1}{16}$ stark $\frac{1}{16}$ deutlich

Eledonepräzipitins serum gibt Niederschlag	mit $\frac{E.P.}{100}$	mit $\frac{O.P.}{100}$
Serum 15a	$\frac{1}{1}$ deutlich	$\frac{1}{1} = 0$
„ 15b (nach weiterer Präzipitinbildung)	$\frac{1}{4}$ deutlich	$\frac{1}{1}$ stark
„ 15c (nach neuer Injektion von E.P.)	$\frac{1}{8}$ deutlich	$\frac{1}{2}$ stark
„ 15d (nach weiterer Präzipitinbildung)	$\frac{1}{16}$ stark	$\frac{1}{8}$ deutlich
„ 15e (nach weiterer Präzipitinbildung)	$\frac{1}{32}$ stark	$\frac{1}{16}$ stark
„ 22	$\frac{1}{8}$ stark	$\frac{1}{2}$ stark

Majapräzipitinserum gibt Niederschlag		mit $\frac{M.P.}{100}$	mit $\frac{D.P.}{100}$
Serum 14		$\frac{1}{8}$ stark	$\frac{1}{1} = 0$
„ 13		$\frac{1}{8}$ stark	$\frac{1}{1} = 0$
„ 4		$\frac{1}{8}$ deutlich	$\frac{1}{1} = 0$
„ 9		$\frac{1}{16}$ stark	$\frac{1}{2}$ stark
„ 7		$\frac{1}{16}$ stark	$\frac{1}{4}$ deutlich
„ 23		$\frac{1}{128}$ stark	$\frac{1}{32}$ deutlich
Dromiapräzipitinserum gibt Niederschlag		mit $\frac{D.P.}{100}$	mit $\frac{M.P.}{100}$
Serum 10		$\frac{1}{32}$ deutlich	$\frac{1}{1} = 0$

spezifische und nicht spezifische Wirkung festgestellt worden ist, mit dem nicht entsprechenden präzipitablen Eiweiß zusammengebracht und dann, nachdem der entstandene Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt worden ist, aufs neue quantitativ auf Präzipitingehalt in Bezug auf die beiden Plasmaarten geprüft. Z. B.: Octopuspräzipitinserum 8 gibt mit Octopusplasma (auf das 100-fache verdünnt) noch in 32-facher Verdünnung einen starken, mit Eledoneplasma (auf das 100-fache verdünnt) in 16-facher Verdünnung einen stark-deutlichen Niederschlag. Das Eledoneplasma gibt mit dem Serum in 3200-facher Verdünnung einen starken Niederschlag. Es wird nun folgende Mischung vorgenommen: 1 ccm Serum 8 + 1 ccm physiologische Kochsalzlösung + 2 ccm auf das 100-fache verdünntes Eledoneplasma. Es entsteht ein starker Niederschlag, der durch die Zentrifuge entfernt wird. Die Flüssigkeit wird weder durch Serum 8 noch durch Eledoneplasma (auf das 100-fache verdünnt) gefällt. Sie gibt aber mit Octopusplasma (auf das 100-fache verdünnt) noch in 4-facher Verdünnung ein starkes Präzipitat. Der Präzipitingehalt des Octopuspräzipitinserums ist demnach durch den Zusatz von Eledoneplasma, wenn man die beim Versuche vorgenommene 4-fache Verdünnung des Serums berücksichtigt, nur um die Hälfte geringer geworden, während die Präzipitinwirkung für Eledoneplasma dabei vollkommen verloren gegangen ist. Würde es sich um ein einheitliches Präzipitin handeln, das auf Octopusplasma ungefähr doppelt so stark wirkt wie auf Eledoneplasma, so müßte der nach der Absorption zurückbleibende Rest auch wieder Eledoneplasma ungefähr $\frac{1}{2}$ mal so stark präzipitieren wie Octopusplasma. Das ist aber nicht der Fall, man erhält ein vollkommen spezifisches Präzipitin, das nur noch Octopusplasma, nicht aber Eledoneplasma zur Fällung bringt.

Man kann diesem Präzipitin Po jetzt noch weiter Eledoneplasma zusetzen, ohne daß eine Präzipitation eintritt, und erhält dadurch eine Flüssigkeit, welche sowohl mit Octopuspräzipitin wie mit Octopusplasma einen Niederschlag gibt. In beiden Fällen sind es aber verschiedene Präzipitine, welche die Reaktion bedingen, beim Zusatz von Octopusplasma das in der Flüssigkeit vorhandene spezifische Po, bei der Mischung mit Octopuspräzipitinserum das nicht spezifische Poe, welches auch auf Eledoneplasma einwirkt.

Entsprechend den spezifischen und nicht spezifischen Teilpräzipitinen müssen auch an den präzipitablen Eiweißkörpern einer bestimmten Tierart verschiedenartige präzipitinbindende Gruppen angenommen werden. Wir haben demnach in Bezug auf die angewandte Versuchsanordnung am Eledoneeiweiß (E) die Gruppen e und eo zu unterscheiden. Die Flüssigkeit, welche sowohl mit Octopusplasma wie mit Octopuspräzipitin ein Präzipitat liefert, enthält also gar nicht zwei reaktionsfähige Substanzen, da Po sich weder mit Ee noch mit Eeo vereinigen kann.

Ganz ähnliche Verhältnisse, wie sie hier künstlich durch das Experiment geschaffen wurden, liegen meines Erachtens auch in den beschriebenen Fällen vor, bei denen im Kaninchenserum zu Anfang der Präzipitinbildung nebeneinander Präzipitin und präzipitabile Substanz vorhanden waren. Auch hier handelt es sich nicht um zwei reaktionsfähige Körper, deren Verbindung aus irgend welchen Gründen unterbleibt, sondern um Substanzen, welche keine Affinität zueinander besitzen. Die betreffenden Kaninchen haben zu dieser Zeit noch nicht alle möglichen Teilpräzipitine gebildet, sondern nur einzelne derselben. Diese zunächst produzierten, nur auf bestimmte Gruppen der präzipitablen Eiweißkörper passenden Partialpräzipitine sind es, welche nach der Ab sättigung aller zur Verfügung stehenden zugehörigen Gruppen der präzipitablen Substanz im Serum nachweisbar werden. Daneben bleibt aber ein anderer Teil der präzipitablen Substanz, der keine Affinität zu dem gebildeten Präzipitin besitzt, bestehen, solange, bis ein anderes Partialpräzipitin von den Kaninchenzellen geliefert wird, welches sich mit Gruppen der in Lösung gebliebenen Eiweißkörper vereinigen kann.

Diese schon an und für sich außerordentlich wahrscheinliche Erklärung gewinnt durch die in Tabelle XI dargestellten Reagenzglasversuche eine besondere Stütze. Wenn Octopusplasma mit einem Ueberschuß eines bestimmten Präzipitinerums versetzt wurde, so gab die Flüssigkeit nach der Bildung des Präzipitates für gewöhnlich mit einem zweiten Präzipitinerum eines anderen Kaninchens ebensowenig einen Niederschlag mehr wie mit dem zur Ausfällung der präzipitablen Substanz verwandten Kaninchenserum. Anders dagegen bei der Benutzung von Serum 2.

Das in diesem Serum enthaltene Präzipitin war nicht auf die gewöhnliche Weise durch intravenöse Injektion von Octopusplasma erzeugt worden, sondern nach intraperitonealer Einführung von durch Alkohol gefälltem Octopusplasma entstanden. Das Alkoholpräzipitat des Octopusplasmas verliert schon nach ganz kurzer Einwirkung von absolutem Alkohol seine Löslichkeit in Wasser oder Kaninchenserum, während die präzipitinbindenden Gruppen teilweise erhalten bleiben¹⁾. Bei meinen Versuchen, wo zur Präzipitation und zum Waschen des Niederschlages nicht mehr als 20 Minuten verwandt wurden, blieb $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{8}$ dieser Gruppen funktionsfähig. Drei normale Kaninchen, denen solches Alkoholpräzipitat von je 8 ccm Octopus- oder Eledoneplasma in feiner Suspension in die Bauchhöhle eingespritzt wurde, lieferten auch nach Wiederholung der Injektion keine Präzipitine und ebensowenig auch die Präzipitinreaktion hemmende Antikörper. Kaninchen 2, das früher mit

1) Daß es sich dabei wirklich um eine elektive Bindung des Präzipitins von seiten des Präzipitates handelt und nicht um eine nicht spezifische Absorption, wurde dadurch festgestellt, daß auf die gleiche Weise dargestelltes Alkoholpräzipitat von Majaplasma dem Octopus- oder Eledonepräzipitinerum kein Präzipitin entzog.

Octopusplasma vorbehandelt worden war, zur Zeit aber kein Präzipitin mehr im Blute aufwies, zeigte dagegen 3 Tage nach der Injektion des Alkoholpräzipitates von 8 ccm Octopusplasma einen geringen, am nächsten Tage schon einen fast 8-wertigen Präzipitingehalt und lieferte 5 Tage nach der Einspritzung das zum Versuch benutzte Serum.

Brachte man dieses Serum im Ueberschuß mit Octopusplasma zusammen, so blieb nach der Entfernung aller durch das gleiche Serum 2 nachweisbaren präzipitablen Substanz noch präzipitables Eiweiß in Lösung, welches durch ein zweites Octopuspräzipitinserum 17 niedergeschlagen wurde, obgleich der absolute Präzipitingehalt beider Sera der gleiche war. Wurde dagegen der umgekehrte Versuch angestellt und dasselbe Octopusplasma zunächst in gleicher Weise mit Serum 17 vermischt, so war auch mit Serum 2 keine weitere Fällung mehr zu erzielen. Es geht aus diesen Bindungsversuchen mit Sicherheit hervor, daß Serum 2 mindestens ein Partialpräzipitin weniger enthält als Serum 17. Diesem fehlenden Teilpräzipitin entspricht ein Bestandteil der präzipitablen Substanz, welcher nur durch dieses Teilpräzipitin, nicht aber durch die anderen Partialpräzipitine ausgefällt werden kann.

Damit hat aber auch das gleichzeitige Vorkommen von Präzipitin und präzipitabler Substanz eine ausreichende Erklärung gefunden. Diese Erscheinung ist, wie gesagt, nicht charakteristisch für die Präzipitinreaktion überhaupt, sie kann nur unter besonderen Bedingungen zu stande kommen. Es ist zunächst dazu erforderlich, daß nach der Injektion eines bestimmten fremdartigen Blutplasmas mindestens zwei verschiedene Präzipitine in ungleichmäßigen Mengenverhältnissen im Kaninchenorganismus entstehen können. Das genügt aber noch nicht, es müssen außerdem solche Präzipitine sein, welche nicht an allen Molekülen der präzipitablen Eiweißkörper entsprechende bindende Gruppen finden, deren Besetzung die Präzipitation hervorruft, da sonst schon jedes Teilpräzipitin, im Ueberschuß zugesetzt, das Ausfallen der gesamten präzipitablen Substanz bedingen müßte.

In dem hier genauer untersuchten Falle war zum Nachweis des neben dem Octopuspräzipitin noch in Lösung gebliebenen Octopuseiweißes noch ein zweites Präzipitinserum notwendig, welches das im ersten Serum viel schwächer vertretene oder ganz fehlende zugehörige Teilpräzipitin enthielt. Es kann aber auch vorkommen, daß die neben dem Präzipitin frei bestehende präzipitabile Substanz durch das gleiche Serum ausfällbar ist, das beim Versuch mit dem fremdartigen Blutplasma vermischt wurde. Hamburger macht eine derartige Angabe¹⁾. Ich selbst habe nur in einem einzigen Falle bei einer etwas komplizierteren Versuchsanordnung solche Verhältnisse wahrgenommen.

Versuch: Octopuspräzipitinserum 18 wird zunächst mit Eledoneplasma zusammengebracht (das Serum gibt mit dem auf das 100-fache verdünnten Eledoneplasma noch in 8-facher Verdünnung einen stark-deutlichen Niederschlag. Das Eledoneplasma gibt in 2048-facher Verdünnung mit dem Serum einen deutlichen Niederschlag). 10 ccm Serum 18 + 0,625 ccm unverdünntes Eledoneplasma. Es entsteht ein starker Niederschlag, der nach 3 Stunden abzentrifugiert wird. Die Flüssigkeit gibt mit Serum 18 in 4-facher Verdünnung einen Niederschlag, dagegen nicht mit Eledoneplasma. Für Octopusplasma besitzt sie noch einen 8-fachen Präzipitingehalt. Man erhält durch dieses Vorgehen also ein Octopuspräzipitinserum, das nur an solchen präzipitinbindenden Gruppen des Octopuseiweißes angreift, die im Eledoneplasma nicht vorkommen. Dieses Serum 18 A wird jetzt mit verschiedenen Mengen von Octopusplasma 11 zusammengebracht (vergl. Tabelle VII).

1) Wien. klin. Wochenschr. 1902. No 45.

Die Flüssigkeit (F) gibt, einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlag durch Zentrifugieren getrennt, einen Niederschlag mit

		O.P.		100		1	1
							1
1,5 ccm Serum 18 A + 0,5 ccm	O.P.11:	$\frac{F}{256}$	stark	$\frac{F}{4}$	=	$\frac{F}{1}$	= 0
1,5 „ „ 18 A + 0,5 „	O.P.11:	$\frac{F}{128}$	deutlich	$\frac{F}{4}$	=	$\frac{F}{1}$	= 0
1,5 „ „ 18 A + 0,5 „	O.P.11:	$\frac{F}{64}$	stark	$\frac{F}{2}$	=	$\frac{F}{1}$	= 0
1,5 „ „ 18 A + 0,5 „	O.P.11:	$\frac{F}{32}$	stark	$\frac{F}{1}$	=	$\frac{F}{1}$	= 0
1,5 „ „ 18 A + 0,5 „	O.P.11:	$\frac{F}{16}$	deutlich	$\frac{F}{1}$	=	$\frac{F}{1}$	deutlich
1,5 „ „ 18 A + 0,5 „	O.P.11:	$\frac{F}{8}$	= 0	$\frac{F}{1}$	=	$\frac{F}{8}$	deutlich

Wir konstatieren demnach hier bei einem bestimmten Mischungsverhältnis einen gleichzeitigen Ueberschuß von Präzipitin des Serums 18 A und von präzipitabler Substanz, die dadurch zur Fällung kommt, daß das gleiche Serum 18 A unverdünnt zugesetzt wird.

Diese Erscheinung muß dann zu stande kommen, wenn die Hauptmenge des Präzipitins zu solchen Bestandteilen des präzipitablen Eiweißes Beziehung hat, die im fremdartigen Blutplasma nur in verhältnismäßig geringer Menge vertreten sind. Z. B.: (4 Pa + 2 Pb) + (2 Ea + 4 Eb) = (2 PaEa + 2 PbEb) + 2 Pa + 2 Eb. Grundbedingung ist natürlich auch hier, daß die verschiedenartigen präzipitinbindenden Gruppen (a und b) auf verschiedene Moleküle der präzipitablen Substanz verteilt sind.

Daß im Octopusplasma wirklich solche differente Körper vorkommen, wird durch folgenden Versuch bestätigt. Ich stellte denselben deshalb an, weil ich sehen wollte, ob das Verschwinden der präzipitablen Substanz aus dem Octopusplasma der Fällung des Hämocyanins durch Ammonsulfat vollkommen entspricht. Es wurde dem Octopusplasma einerseits konzentrierte Ammonsulfatlösung in großem Ueberschuß zugefügt. Die vom gebildeten Präzipitat abfiltrierte Flüssigkeit gab dann keine Eiweißreaktion und enthielt ebenso auch keine durch Präzipitins serum nachweisbare präzipitabile Substanz mehr. Andererseits versetzte ich 10 ccm Octopusplasma mit nur soviel konzentrierter Ammonsulfatlösung, daß das gesamte Plasma gerade anfang, trübe zu werden. Die große Masse des Hämocyanins fiel dann im Verlaufe der nächsten 2 Tage in Form eines mikrokristallinischen Breies aus; die nur sehr schwer durch Filtration mittels der Saugpumpe zu gewinnende Flüssigkeit (1,5 ccm) enthielt aber auch noch etwas Eiweiß. Der Hämocyaninbrei, der ein Volumen von 10 ccm einnahm, war in 1-proz. Kochsalzlösung wieder sehr leicht löslich und zeigte nahezu den gleichen Gehalt an präzipitabler Substanz wie das nicht modifizierte Plasma. Die abgesaugte Flüssigkeit enthielt dagegen verhältnismäßig sehr viel weniger präzipitabile Substanz. Dabei zeigten sich sehr bemerkenswerte Unterschiede, wenn verschiedene präzipitierende Sera zur Prüfung benutzt wurden. Die Flüssigkeit wurde von Serum 2 noch in 4-facher Verdünnung, von einem anderen Serum 17 dagegen noch in 64-facher Verdünnung stark gefällt, obgleich das zum Versuch verwandte Octopusplasma durch beide Sera in gleicher Weise noch in 2048-facher Verdünnung stark präzipitiert wurde. Diejenigen Bestandteile des Octopusplasmas, welche nur durch das dem Serum 2 fehlende Partialpräzipitin des Serums 17 nieder-

geschlagen werden können, sind demnach bei der Ausfällung durch Ammonsulfat in verhältnismäßig größerer Menge in Lösung geblieben als die anderen durch Serum 2 in gleicher Weise präzipitablen Eiweißkörper.

Daß die durch Präzipitine fällbaren Substanzen des Octopusplasmas Eiweißkörper sind, ist wohl mit Sicherheit anzunehmen; es spricht dafür nicht nur das soeben beschriebene Verhalten der präzipitablen Substanz bei der Ammonsulfatfällung des Hämocyanins, sondern auch die Beschaffenheit des Präzipitates. Der Kupfernachweis¹⁾ ist dabei nicht einmal unumgänglich notwendig, da das Hämocyanin sich bei der Ausfällung von konzentriertem Octopusplasma durch ein starkes Präzipitinserum schon ohne weiteres im Niederschlage zu erkennen gibt; das gewaschene Präzipitāt zeigt eine blaue Farbe, die durch Zuleiten von Kohlensäure verschwindet und beim Schütteln mit Luft wieder erscheint. Das Hämocyanin ist demnach kein einheitlicher Eiweißkörper, sondern aus verschiedenartigen Molekülen zusammengesetzt.

Zeigen uns diese Beobachtungen, daß bestimmte Präzipitin-bindende Gruppen der präzipitablen Substanz nicht bei allen chemischen Individuen derselben vorzukommen brauchen, so ist damit doch noch nicht gesagt, daß die einzelnen präzipitablen Moleküle sich nur mit einer einzigen Art von Präzipitin verbinden können. Ich habe daher zur Entscheidung dieser Frage noch weiter untersucht, ob nach der Ausfällung von Eledoneplasma durch das alloio gene Präzipitin Poe eines Octopuspräzipitinserums noch präzipitabile Substanz in Lösung bleibt, welche erst durch das isogene Teilpräzipitin Pe eines Eledonepräzipitinserums niedergeschlagen wird.

Versuch: Es wird benutzt ein Octopuspräzipitinserum 13, welches mit verdünntem Octopusplasma in 16-facher Verdünnung einen stark-deutlichen, mit verdünntem Eledoneplasma in 8-facher Verdünnung einen deutlichen Niederschlag gibt, ein Eledonepräzipitinserum 15, welches mit verdünntem Eledoneplasma in 32-facher Verdünnung einen starken, mit verdünntem Octopusplasma in 16-facher Verdünnung einen starken Niederschlag gibt, und ein Eledoneplasma, welches sowohl mit Serum 13 wie mit Serum 15 wie mit dem auf das 16-fache mit Kochsalzlösung verdünntem Serum 15 ungefähr auf die gleiche Weise noch in 1600-facher Verdünnung einen starken Niederschlag gibt.

				Die nach einigen Stunden abzentrifugierte Flüssigkeit (F) gibt Niederschlag mit			
		E.P.	F	Serum 13	Serum 15	O.P.	
		$\frac{\quad}{100}$				$\frac{\quad}{100}$	
3 ccm	Octopuspräzipitinserum + 1 ccm	E.P. $\frac{400}{\quad}$	$\frac{F}{4}$ stark	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$		
3 "	" " + 1 "	E.P. $\frac{200}{\quad}$	$\frac{F}{2}$ deutlich	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$		
3 "	" " + 1 "	E.P. $\frac{100}{\quad}$	$\frac{F}{1}$ stark deutlich	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$		
3 "	" " + 1 "	E.P. $\frac{50}{\quad}$	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{8}$ deutlich	

Das Octopuspräzipitinserum hat demnach durch Verbindung mit Eledoneplasma, genau wie in dem früher schon beschriebenen Falle, nur das Präzipitin Poe verloren, welches an den bei beiden Cephalopodenarten vorkommenden Gruppen angreift, während das nur auf Octopusplasma einwirkende Teilpräzipitin Po vollkommen in Lösung geblieben ist. Das präzipitabile Eiweiß des Eledoneplasmas ist dagegen schon

1) v. Dungern, Die Antikörper. p. 74.

unter dem Einflusse des alloigenen Teilpräzipitins Poe vollkommen in den Niederschlag übergegangen.

In gutem Einklange damit steht auch das Ergebnis eines anderen Versuches: Bei einem bestimmten Octopusplasma wurde festgestellt, wie weit man dasselbe verdünnen kann, um noch einen starken Niederschlag mit Präzipitin zu erhalten. Es wurden dabei die gleichen Werte gefunden, gleichgültig, ob mit dem unveränderten Octopuspräzipitinserum 13, das beide Komponenten Po und Poe enthielt, geprüft wurde, oder nur mit dem Teilpräzipitin Po.

Man muß daher annehmen, daß die einzelnen präzipitablen Eiweißmoleküle für verschiedenartige Präzipitine entsprechende bindende Gruppen besitzen.

Da es aus diesem Grunde nicht möglich ist, durch Absorption eine solche präzipitable Substanz darzustellen, welche dem spezifischen Teilpräzipitin entsprechend nur durch dieses ausfällbar ist, so gelingt es auch nicht, mit der Absorptionsmethode das spezifische Teilpräzipitin aus einem Serum zu entfernen und dadurch ein solches Präzipitin zu gewinnen, das auf die gelösten Eiweißkörper von 2 verwandten Tierarten gleich stark einwirkt.

Es war dagegen möglich, solche nicht spezifische Präzipitinsera durch eine besondere Art der Immunisierung zu erzeugen. Das Präzipitin erscheint nämlich, wie aus meinen früheren Versuchen hervorgeht¹⁾, auf die Einführung der präzipitablen Substanz hin im Blute eines schon früher mit dem gleichen fremdartigen Eiweiß vorbehandelten Kaninchens rascher und in größerer Menge als in dem eines Normaltieres, eine Tatsache, welche ich durch Neubildung entsprechender Rezeptoren der Zellen erklären konnte. Wenn man nun einem normalen Kaninchen zunächst das Blutplasma einer bestimmten Tierart einspritzt, und dann, nachdem das auf diese Injektion hin produzierte Präzipitin wieder aus dem Blute verschwunden ist, zum zweitenmal nicht mehr dasselbe, sondern nur verwandtes präzipitables Eiweiß einführt, so muß die Präzipitinproduktion zunächst nur gegenüber denjenigen Gruppen der präzipitablen Substanz erfolgen, mit welchen das Kaninchen schon bei der ersten Injektion in Berührung gekommen ist, und das sind eben die den beiden verwandten Tierarten gemeinschaftlichen bindenden Gruppen²⁾. Man erhält daher auf diese Weise ein Präzipitin, welches seine spezifische Beziehung zu demjenigen Eiweiß, das zu seiner Entstehung Veranlassung gab, scheinbar eingebüßt hat, indem es das Eiweiß einer anderen Tierart gleich stark präzipitiert; in Wirklichkeit erklärt sich aber alles durch die einseitige Ausbildung eines Teilpräzipitins.

Die komplexe, in ihren einzelnen Bestandteilen wechselnde Zusammensetzung der präzipitierenden Sera macht auch die eigentümlichen, von Eisenberg zuerst beschriebenen, Bindungsverhältnisse leicht verständlich. Es ist ja nicht zu erwarten, daß alle Teilpräzipitine, deren es eine größere Anzahl geben muß, proportional der Menge der einzelnen zugehörigen Gruppen der präzipitablen Substanz gebildet werden. Schon die Tatsache, daß die Präzipitinsera verschiedener Individuen sich in un-

1) Die Antikörper. Kapitel V u. VI.

2) Auf die Bedeutung dieser Erscheinung für die Rezeptorentheorie braucht hier nicht eingegangen zu werden. Die Versuche und Protokolle sollen noch an anderer Stelle genauere Besprechung finden.

gleicher Weise mit der zugehörigen präzipitablen Substanz vereinigen, weist darauf hin, daß die eine oder die andere dieser verschiedenartigen Gruppen der fremdartigen Eiweißkörper leichter als die übrigen zur Präzipitinproduktion Veranlassung gibt. Ist dies aber der Fall, so können die quantitativen Absorptionsverhältnisse für die einzelnen Partialpräzipitine nicht die gleichen sein: Um die differenten präzipitierenden Körper einer bestimmten Serummenge vollkommen zu absorbieren, sind dann jeweils verschiedene Mengen des präzipitablen Plasmas notwendig. Eine gegebene Quantität präzipitabler Substanz kann der zum Bindungsversuch benutzten Serummenge daher einzelne Teilpräzipitine ganz entziehen, ohne damit ihre Absorptionsfähigkeit für die gleichartigen Präzipitine ganz zu verlieren, während andere Partialpräzipitine nach der Besetzung aller entsprechenden Gruppen des vorhandenen Eiweißes teilweise in Lösung bleiben. Bei einer Vermehrung des gesamten Präzipitins und gleichbleibender Eiweißmenge wird die absolute Absorption von Präzipitin somit steigen, da bei dem geringeren Serumzusatz noch nicht alle verschiedenen bindenden Gruppen des Eiweißes mit Präzipitin besetzt sind, die relative Absorption dagegen fallen, da einzelne Teilpräzipitine die ihnen entsprechenden Gruppen der präzipitablen Substanz schon bei geringerem Serumzusatz vollkommen sättigen. Wird andererseits immer die gleiche Präzipitinmenge mit steigendem Zusatz von Eiweiß versehen, so kann die Zahl der absorbierten Einheiten des Gesamtpräzipitins nicht proportional der zugesetzten Eiweißmenge zunehmen, weil bei Steigerung der Eiweißmenge immer mehr Partialpräzipitine vollkommen absorbiert werden.

Die Richtigkeit dieser Anschauung konnte auch experimentell bestätigt werden. Es wurden Octopuspräzipitins- und Octopusplasma in solchem Mengenverhältnis gemischt, daß nach der Bildung des Niederschlages in der Flüssigkeit noch ein Teil des Präzipitins in Lösung blieb. Das gewaschene Präzipitat zeigte sich dann trotzdem befähigt, dem aufs neue zugesetzten Serum weiteres Präzipitin zu entziehen und zwar auch dann, wenn die Konzentration dieses Gesamtpräzipitins keine größere war, als diejenige des ungebunden gebliebenen Teilpräzipitins.

Die Bindungsgesetze, welche bei der Ausfällung von präzipitabilem Plasma durch präzipitierendes Antiserum zum Ausdruck kommen, werden demnach wesentlich durch die komplexe Zusammensetzung der reagierenden Substanzen beherrscht.

Daneben macht sich in den Bindungsversuchsreihen aber noch ein anderes sehr bemerkenswertes Moment geltend: Die quantitative Vereinigung der präzipitierenden Antikörper des Serums mit den Eiweißsubstanzen der fremden Tierart vollzieht sich nicht nur bei einem einzigen bestimmten Mengenverhältnis der reaktionsfähigen Körper, sondern unter vielfachen Konzentrationsbedingungen. Aus dieser Tatsache allein ist noch nicht zu entnehmen, ob ein Teil präzipitabile Substanz sich mit mehreren Teilen Präzipitin verbinden kann, oder ob umgekehrt ein Teil Präzipitin sich mit verschiedenen Mengen präzipitabler Substanz vereinigt. Aus den oben beschriebenen Versuchen mit spezifischen und nicht spezifischen Teilpräzipitinen geht aber mit Sicherheit hervor, daß den Molekülen der präzipitablen Substanz die komplexere Konstitution in Bezug auf bindende Gruppen zugeschrieben werden muß. Das präzipitabile Eiweißmolekül kann sich demnach mit einer wechselnden Zahl von Präzipitinmolekülen zu verschiedenartigen Ver-

bindungen vereinigen, die als Präzipitate aus der Flüssigkeit ausfallen. Das Gesetz der multiplen Proportionen, welches von Jost¹⁾ und von Eisenberg und Volk²⁾ für die Verbindung der agglutinablen Substanz mit dem Agglutinin festgestellt wurde, gilt also auch für die Präzipitinreaktion.

Es liegt nahe, den Versuch zu machen, aus den Ergebnissen der Bindungsversuche auch die Zahl der Präzipitin-bindenden Gruppen abzuleiten, welche den präzipitablen Eiweißmolekülen angehören. Dem steht aber die komplizierte Zusammensetzung des Präzipitinerums aus verschiedenartigen Teilpräzipitinen mit allen ihren Folgeerscheinungen als nicht zu unterschätzendes Hindernis entgegen. In der Mehrzahl der Fälle ist ja wohl zu konstatieren, daß das Verhältnis zwischen der Präzipitinmenge und der Menge präzipitabler Substanz ungefähr um das Vierfache schwanken kann, ohne daß bei der Bindung ein Ueberschuß in der Flüssigkeit in Lösung bleibt. Eine gewisse Gesetzmäßigkeit muß hier auch vorliegen, da man bei der Prüfung von Eiweißarten, die ganz verschiedenen Tierarten angehören, fast genau die gleichen Werte erhalten kann. Es kommen daneben aber doch auch solche Sera vor, deren Präzipitine sich nicht unter denselben mehrfachen Konzentrationsbedingungen restlos mit der präzipitablen Substanz verbinden. Sie bilden den Uebergang zu dem schon besprochenen extremen Fall, wo Präzipitin und präzipitabler Eiweißkörper gleichzeitig nebeneinander beobachtet werden.

Es ist außerdem noch zu berücksichtigen, daß die präzipitablen Eiweißmoleküle erst bei Besetzung mehrerer bindender Gruppen durch Präzipitin unlöslich werden und in das Präzipitat übergehen. Wenigstens glaube ich auf dieses Verhalten darauf schließen zu können, daß ein zu großer Ueberschuß von präzipitabler Substanz die Niederschlagsbildung verringert oder ganz aufhebt [Halban und Landsteiner³⁾, Eisenberg⁴⁾, v. Dungern⁵⁾, P. Müller⁶⁾]. Diese Erscheinung ist in der Tat, wie aus meinen Versuchen klar hervorgeht (Tabelle II, IV u. VII), durch die relative Herabsetzung des Präzipitingehaltes bedingt. Das Präzipitin verteilt sich dabei, wie man annehmen muß, auf soviel Eiweißmoleküle, daß die von jedem einzelnen Molekül gebundene Menge zu dessen Präzipitation nicht mehr ausreicht.

Aus all diesen Gründen ist es nicht möglich, die Bindungsvorgänge, welche beim Vermischen eines durch spezifische Vorbehandlung gewonnenen Präzipitinerums mit zugehörigem Blutplasma an den einzelnen verschiedenen bindenden Gruppen stattfinden, quantitativ vollkommen zu analysieren. Es sind dazu einfachere Verhältnisse notwendig, die man wohl beim Studium der Präzipitine normaler Sera finden wird. Eisenberg und Volk⁶⁾ konstatierten bei der Untersuchung normaler Agglutinine die interessante Tatsache, daß Typhusbacillen dem normalen Pferde- und Ziegenserum immer die gleiche Menge Agglutinin, die einfach agglutinierende Dose entziehen, mag die Konzentration des Agglutinins noch so verschieden sein. Ehrlich und Morgenroth⁷⁾ fanden für

1) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XL. 1902.

2) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XL. 1902.

3) Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 12.

4) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. 1902. p. 773.

5) Die Antikörper. p. 77.

6) l. c.

7) Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 10.

ein bestimmtes Immunnämolyisin das gleiche einfache Bindungsgesetz. Diese Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß auch in den komplizierten Fällen die Bindung der einzelnen Partialpräzipitine an die entsprechenden Gruppen der präzipitablen Substanz nach einfachen chemischen Proportionen vor sich geht.

Es gelingt aber mit Hilfe der Absorptionsmethode, noch andere wichtige Fragen experimentell zu entscheiden. Man kann einerseits untersuchen, ob die mit wenig Präzipitin ausgefallte präzipitabile Substanz als Niederschlag noch ebensoviel Präzipitin zu binden vermag wie in gelöstem Zustande und andererseits prüfen, ob das mit einer verhältnismäßig geringen Menge Eiweiß verbundene Präzipitin neu zugesetzte präzipitabile Substanz noch ebenso auszufällen vermag, wie vor der Bindung. Man bemerkt bei solchen Untersuchungen einen prinzipiellen Unterschied: Das nach der Präzipitation zugefügte Präzipitin wird vom Niederschlag noch sehr leicht absorbiert. In der Mehrzahl der Fälle kann von der durch wenig Präzipitin ausgefallten präzipitablen Substanz ebensoviel Präzipitin gebunden werden wie von der gelösten, die von vornherein mit der ganzen Präzipitinmenge versetzt wird, bei einigen Versuchen wird die Bindungsfähigkeit des präzipitablen Eiweißes durch die Präzipitation etwas, aber nicht erheblich abgeschwächt. Das Präzipitin vermag dagegen nur eine erheblich geringere Menge von präzipitabilem Eiweiß niederzuschlagen, wenn es zunächst mit einem Teil desselben verbunden wird. z. B.

Versuch mit Eledonepräzipitinserum 15 und Eledoneplasma 1 (vergleiche Tabelle IV).

Die Flüssigkeit (F) gibt einige Stunden nach der Vereinigung vom Niederschlag getrennt Niederschlag mit

		E.P.1	Ser. 15
		100	1
1,5 ccm Serum 15 + 0,5 ccm	$\frac{E.P.1}{16}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.1}{16}$ und nach mehreren Stunden noch 1,5 ccm	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{64}$ stark
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.1}{8}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.1}{8}$ und nach mehreren Stunden noch 1,5 ccm Ser. 15:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 15 + 0,5 „	$\frac{E.P.1}{4}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$
2 „ 1-proz. NaCl-Lösung + 1,5 ccm	$\frac{E.P.1}{16}$:		$\frac{F}{128}$ deutlich

Versuch mit Octopuspräcipitinserum 21 und Octopusplasma 12 (vergleiche Tabelle IX).

		F mit O.P.12	mit Ser. 21
		100	1
1,5 ccm Serum 21 + 0,5 ccm	$\frac{O.P.12}{32}$:	$\frac{F}{8}$ deutlich	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 21 + 0,5 „	$\frac{O.P.12}{16}$:	$\frac{F}{1}$ deutlich	$\frac{F}{1} = 0$
Niederschlag von	$(1,5 \text{ ccm Serum } 21 + 0,5 \text{ ccm } \frac{O.P.12}{16}) + 1,5 \text{ ccm Serum } 21$:	$\frac{F}{8}$ stark	$\frac{F}{1} = 0$

der gleiche Niederschlag, $\frac{3}{4}$ Std. alt + 0,5 ccm $\frac{\text{O.P.12}}{16}$ + 1,5 ccm NaCl-Lösung:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{16}$ stark
„ „ „ 24 „ „ + 0,5 „ $\frac{\text{O.P.12}}{16}$ + 1,5 „ „ „	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{16}$ stark
0,5 „ $\frac{\text{O.P.12}}{16}$ + 1,5 „ „ „	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{64}$ stark
1,5 ccm Serum 21 + 0,5 ccm $\frac{\text{O.P.12}}{8}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{4}$ stark
Niederschlag von (1,5 ccm Serum 21 + 0,5 ccm $\frac{\text{O.P.12}}{8}$) 24 Stunden alt +		
0,5 ccm $\frac{\text{O.P.12}}{8}$ + 1,5 ccm NaCl-Lösung:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{64}$ deutlich
0,5 „ $\frac{\text{O.P.12}}{8}$ + 1,5 „ „ „ :	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{128}$ stark
1,5 ccm Serum 21 + 0,5 ccm $\frac{\text{O.P.12}}{4}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{16}$ stark

Versuch mit Majapräzipitinserum 20 und Majaplasma 2
(vergleiche Tabelle II).

	F mit $\frac{\text{M.P.2}}{100}$	mit $\frac{\text{Ser. 20}}{1}$
1,5 ccm Serum 20 + 0,5 ccm $\frac{\text{M.P.2}}{2}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{128}$ deutlich
1,5 „ „ 20 + 0,5 „ $\frac{\text{M.P.2}}{2}$ und dazu nach einigen Stunden	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{2}$ stark
1,5 „ „ 20 + 0,5 „ $\frac{\text{M.P.2}}{4}$ 1,5 ccm Ser. 20 + 0,5 ccm NaCl-Lösung:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{8}$ deutlich
1,5 „ „ 20 + 0,5 „ $\frac{\text{M.P.2}}{4}$ und dazu nach einigen Stunden	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „ $\frac{\text{M.P.2}}{8}$ 1,5 ccm Ser. 20 + 0,5 ccm NaCl-Lösung:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „ $\frac{\text{M.P.2}}{8}$ und dazu nach einigen Stunden	$\frac{F}{1}$ stark	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „ $\frac{\text{M.P.2}}{16}$ 1,5 ccm Ser. 20 + 0,5 ccm NaCl-Lösung:	$\frac{F}{1}$ stark	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „ $\frac{\text{M.P.2}}{16}$ und dazu nach einigen Stunden	$\frac{F}{4}$ deutlich	$\frac{F}{1} = 0$
1,5 „ „ 20 + 0,5 „ $\frac{\text{M.P.2}}{32}$ 1,5 ccm Ser 20 + 0,5 ccm NaCl-Lösung:	$\frac{F}{4}$ stark	$\frac{F}{1} = 0$

Versuch mit Octopuspräzipitinserum 2 und Octopusplasma 13
(vergleiche Tabelle XI).

	F mit $\frac{\text{O.P.13}}{100}$	mit $\frac{\text{Ser. 2}}{1}$
1,5 ccm Serum 2 + 0,5 ccm $\frac{\text{O.P.13}}{8}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$
Ebenso und nach 5 Minuten ¹⁾ noch 0,5 ccm $\frac{\text{O.P.13}}{8}$ + 1,5 ccm NaCl-Lösung:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{16}$ stark
„ „ „ 15 „ „ 0,5 „ $\frac{\text{O.P.13}}{8}$ + 1,5 „ „ „ :	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{64}$ deutlich
„ „ „ 18 Stunden „ 0,5 „ $\frac{\text{O.P.13}}{8}$ + 1,5 „ „ „ :	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{64}$ deutlich
3,5 ccm 1-proz. NaCl-Lösung + 0,5 ccm $\frac{\text{O.P.13}}{8}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{64}$ deutlich
1,5 ccm Serum 2 + 0,5 ccm $\frac{\text{O.P.13}}{4}$:	$\frac{F}{1} = 0$	$\frac{F}{1} = 0$

1) Das Präzipitat ist nach 5 Minuten schon ausgefallen, die Flüssigkeit enthält weder Präzipitin noch präzipitable Substanz.

Die Verschiedenheit, die sich zwischen dem Verhalten des durch wenig präzipitable Substanz verankerten Präzipitins und der durch wenig Präzipitin gefällten präzipitablen Substanz zeigt, ist auch sehr leicht verständlich. Die Moleküle der präzipitablen Eiweißkörper besitzen ja, wie schon nachgewiesen wurde, mehrere Präzipitin-bindende Gruppen, jedes Präzipitin kann dagegen nur durch eine bindende Gruppe mit dem zugehörigen Eiweißmolekül in Verbindung treten. Sind die präzipitablen Moleküle daher durch weniger Präzipitin gefällt, als sie zu binden vermögen, so ist nur ein Teil ihrer bindenden Gruppen mit Präzipitin besetzt, die anderen sind aber noch frei und können demnach ohne weiteres mit neu zugefügtem Präzipitin in Verbindung treten, vorausgesetzt, daß durch den Vorgang der Präzipitation selbst nicht eine Aenderung der Affinitätsverhältnisse stattgefunden hat. Werden die Präzipitinmoleküle dagegen durch weniger präzipitable Substanz in Beschlag genommen, als sie bei Gegenwart einer größeren Menge derselben ausfällen können, so ist zu einer Präzipitation weiterer neu zugesetzter präzipitabler Substanz erst eine Loslösung der Präzipitine aus der ursprünglichen Verbindung notwendig.

Eine solche Abspaltung der Präzipitine kann in der Tat bis zu einem gewissen Grade stattfinden. Die gleiche Erscheinung ist ja auch für Agglutinine und hämolytische Immunkörper festgestellt. Jost¹⁾ fand, daß normale Typhusbacillen, die mit agglutinierten Typhusbacillen in physiologischer Kochsalzlösung zusammengebracht werden, der Wirkung des schon gebundenen Agglutinins unterliegen, wenn mit den agglutinierten Typhusbacillen ein Multiplum der zur Agglutination ausreichenden Agglutinindose vereinigt worden ist, und Morgenroth²⁾ konstatierte bei gleichartiger Versuchsanordnung, daß hämolytische Immunkörper von den mit ihnen verbundenen roten Blutkörperchen auf andere Erythrocyten übergehen, solange kein Komplement zugesetzt wird.

Die Umlagerung des einmal gebundenen Präzipitins ist aber doch eine beschränkte. Sie kann in einem der untersuchten Fälle überhaupt nur in der allerersten Zeit nach der Bindung vor sich gehen und ist schon nach 15 Minuten vollkommen aufgehoben. In anderen Fällen wird die Verbindung auch noch später gelöst und zwar nach 24 Stunden in gleicher Weise wie nach $\frac{3}{4}$ Stunden; die Menge des abgespaltenen Präzipitins entspricht aber auch hier nicht der neu zugesetzten Eiweißmenge, die Reversibilität ist unvollkommen. Zur Erklärung kann man annehmen, daß nach der ersten Verbindung der reagierenden Substanzen noch weitere Bindungen und Umsetzungen durch seitliche Gruppen zustande kommen, was bei der Größe und der komplexen Zusammensetzung dieser Moleküle auch leicht verständlich erscheint. Dieser Hemmung der Umkehrbarkeit des Bindungsprozesses dürfte für die Wirkung spezifischer Antikörper überhaupt eine größere Bedeutung zuzuschreiben sein.

Freiburg i. B., Mai 1903.

1) l. c.

2) Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 2.

Nachdruck verboten.

De l'influence des toxines diphtérique et tétanique sur l'hémoglobine, la morphologie et le poids spécifique du sang.

[Travail de l'Institut de pathologie générale et expérimentale de M. le Prof. N. G. Ouchinsky à l'Université Imperial de Varsovie.]

Par le Docteur **Henri Kucharzewski**,

Médecin de l'Hôpital Evangélique à Varsovie.

(Communication présenté au XIV Congrès International de Médecine à Madrid.)

L'influence des toxines sur les modifications du sang n'a pas encore été soumise à une étude approfondie. On possède, il est vrai, les travaux de Chatenay (1), de Nicolas et Courmont (2), de Bésredka (3), de Nicolas, Courmont et Prat (4), de Zargaroff (5), de Werigo (6), de Bianchi-Mariotti (7), de Butia-gin (8), mais ces auteurs ne se sont pas mis à l'abri de tout reproche; tantôt ils n'envisagent la question qu'à certains points de vue, tantôt ils s'appuient sur un nombre insuffisant de faits, tantôt ils manquent de précision, enfin les conclusions des uns contredisent celles des autres.

Vu cet état de choses nous résolûmes de reprendre la dite question et d'y consacrer une série d'expériences.

Nous tenons à communiquer les conclusions générales auxquelles ces nombreuses expériences nous autorisent.

Nous avons opéré sur des lapins mâles de poids plus ou moins égal d'environ 2 kilos nous leur injections sous la peau des toxines à doses variées, puis nous examinions à divers intervalles le sang obtenu par une piqure légère à la veine périphérique de l'oreille.

Nous avons eu soin de piquer chaque fois un autre point de l'oreille. Chez les animaux qui succombaient, nous examinions le sang jusqu'à la mort 2 ou 3 fois par jour, chez les survivants, le même examen était répété jusqu'à ce que le sang redevenne normal c. a. d. au même état qu'avant l'injection. L'examen du sang consistait à compter le nombre de globules blancs et rouges (suivant Thoma-Zeiss), à déterminer la quantité d'hémoglobine (suivant Gowers) et la densité du sang (suivant Hammerschlag), enfin à faire des préparations sèches du sang sur des lamelles. Les préparations étaient colorées à l'hémateine et à l'éosine ou parfois, à titre de comparaison, aux réactifs colorants d'Ehrlich (Triacid). Sur ces préparations on pouvait déterminer le nombre absolu de chaque variété de leucocytes pour un millimètre cube de sang et puis le % représenté par chaque variété de ces éléments. En déplaçant les préparations sous le microscope à l'aide de la table mobile de Reichert, nous avons compté sur chaque préparation près de 500 globules blancs de cinq types différents: éosinophiles, pseudoéosinophiles ou neutrophiles, lymphocytes, grands mononucléaires, enfin des formes intermédiaires à noyaux multiples.

On notait le poids quotidien de chaque lapin et deux fois par jour sa température rectale.

Avant chaque expérience, le sang était examiné à plusieurs reprises pour établir son état normal.

A. La toxine diphtérique.

Dans nos recherches nous nous sommes servi de toxine diphtérique, préparée à l'Institut bactériologique du Dr. Palmirski à Varsovie. En qualité de dose habituellement mortelle (suivant Ehrlich) pour un lapin de 2 kilos, nous avons admis 0,1 cm c., et nous injections de 0,01 à 4,0 cm à doses faibles, moyennes ou massives. Les doses faibles de 0,01—0,05 cm cubes tantôt tuaient l'animal en 5, 6, 7 ou 8 jours, tantôt le laissaient vivre en état cachectique parfois même totalement guéri. Les doses moyennes de 1,0—2,0 cm cubes tuaient en 3 à 4 jours; les doses massives de 3,0—4,0 cm cubes tuaient en 24 à 48 heures.

Voici les conclusions aux quelles ces recherches nous ont amené:

1) La toxine diphtérique à doses massives ou moyennes provoque la diminution du nombre d'hématies et de la quantité d'hémoglobine; les doses faibles sont dépourvues de cette action.

2) Les doses massives de toxine diphtérique augmentent la densité du sang; les doses moyennes et les faibles restent à ce point de vue sans effet.

3) La toxine diphtérique provoque toujours l'hyperleucocytose dont le degré n'est pourtant pas en rapport direct avec la quantité de toxine introduite. Dans les cas mortels, l'hyperleucocytose va en croissant jusqu'à la mort de l'animal; lorsque celui-ci survit (injection des doses faibles), le nombre de leucocytes finit par diminuer sans cependant atteindre l'état normal.

4) Dans cette hyperleucocytose le rôle principal revient aux pseudo-éosinophiles dont le nombre relatif et absolu augmente notablement. L'accroissement du nombre de pseudoéosinophiles peut être constaté bientôt après l'injection; le phénomène s'accroît jusqu'à la mort de l'animal; dans les cas non mortels, après une période d'augmentation passagère, on voit survenir une diminution des sus-dits éléments. Le nombre relatif (le ‰) de lymphocytes diminue dans tous les cas, ce phénomène devenant de plus en plus manifeste jusqu'au moment du décès. Après l'injection des doses faibles, la période de diminution de lymphocytes est suivie d'une période inverse d'accroissement de leur quantité. Les éosinophiles deviennent moins nombreux dans les cas mortels, voire même ils disparaissent complètement; au contraire chez les lapins qui survivent nous avons noté l'hyperplasie de ces éléments.

Les grands mononucléaires et les formes intermédiaires ne présentaient guère de modifications quantitatives.

5) La température du corps s'élève après les injections, ensuite elle décroît progressivement étant à l'approche du décès au dessous de la normale. Le poids de l'animal diminue également jusqu'à la mort.

Les expériences de contrôle: l'injection de toxine absolument neutralisée par un chauffage prolongé à 70°, l'injection de bouillon-prouvent que les modifications du sang produites par la toxine diphtérique ne tiennent pas au milieu dissolvant, mais à l'action seule de l'agent toxique.

B. La toxine tétanique.

La toxine tétanique qui servait à nos expériences provenait de l'usine de produits chimiques Meister Lucius et Bruning à Hoechst sur Main (fioles plombées à l'étiquette Tetanus-Testgift Va). En qualité de dose mortelle de cette toxine, nous admettons 0,15 cm c. pour un lapin de 2 kilos. A nos lapins nous avons injecté des quantités variant de

0,01 à 2,4 cm c. à doses faibles, moyennes ou massives. Les doses faibles (de 0,01 à 0,1), déterminaient tantôt la mort de l'animal au bout de 8 jours, tantôt un état de cachéxie; parfois cependant il y avait guérison complète. Les doses moyennes de 0,2—1,0 cm c. étaient suivies de mort au 3^{me}, 4^{me} ou 5^{me} jour; les doses massives de 1,7—2,4 cm cubes tuaient en 24 à 48 heures.

Conclusions.

1) La toxine tétanique détermine la diminution du nombre d'hématies et de la quantité d'hémoglobine. Le degré de cette modification varie selon la dose de toxine introduite.

2) Les doses massives de toxine tétanique abaissent la densité du sang; les doses moyennes et les faibles ne produisent guère un changement pareil.

3) La toxine tétanique détermine l'hyperleucocytose moins accusée toutefois que celle qui est due à la toxine diphtérique. Cette hyperleucocytose n'est pas en rapport direct à la quantité de toxine injectée. Immédiatement après l'injection de toxine surtout après les doses considérables, c'est l'hypoleucocytose qui apparaît d'emblée, mais bientôt elle change en phénomène contraire — l'hyperleucocytose.

Dans les expériences à doses faibles après la période d'hypoleucocytose la quantité de leucocytes redevient normale.

4) Le nombre de pseudoéosinophiles augmente, celui de lymphocytes s'abaisse surtout après l'injection à doses massives. Les éosinophiles sont toujours en moindre proportion.

La quantité de grands mononucléaires et d'éléments intermédiaires ne varie guère.

5) Le poids de l'animal diminue progressivement. La température ne présente pas d'oscillations notables.

6) Les expériences sur les animaux-témoins: injection de toxine dont l'action avait été annihilée par un chauffage prolongé ont prouvé que les modifications du sang dépendent exclusivement de l'agent toxique même, à et non du milieu dissolvant.

Nos expériences prouvent d'une façon manifeste que l'organisme animal réagit contre l'infection et l'intoxication par des modifications morphologiques du sang. Or une question s'impose.

Cette sensibilité spéciale du sang ne pourrait elle servir comme symptôme clinique quant au pronostic et au diagnostic des certains cas?

Cette considération nous paraît bien admissible.

Ainsi nous venons de démontrer que dans les intoxications mortelles, les éosinophiles diminuent de nombre ou même disparaissent complètement, tandis que chez les animaux qui survivent leur quantité dépasse la normale. Quand au pronostic c'est un fait d'une haute importance d'autant plus qu'il vient d'être confirmé par de recherches cliniques [Pitkianien (9)]. En ce qui concerne le diagnostic relevons le fait sus-indiqué que les modifications du sang (accroissement du nombre de pseudoéosinophiles) apparaissent presque immédiatement après l'intoxication de l'organisme, au moment où on ne trouve guère de trace d'une réaction leucocytaire générale. En suite ces modifications du sang persistent long — temps après la disparition de tout autre phénomène d'intoxication. Ce fait a été mis en évidence par les observations cliniques de Gundobin (10) et Bésredka (l. c.)

L'accroissement du nombre de pseudoéosinophiles ou de neutrophiles constitue donc un signe précoce du processus infectieux, permettant de reconnaître ce dernier avant que d'autres symptômes surgissent. D'autre part, lors de la convalescence du sujet, ce même phénomène nous avertit que la toxine n'est pas éliminée totalement de l'organisme.

En résumé nous pouvons donc conclure que dans les maladies infectieuses l'examen des polynucléaires n'est guère dépourvu d'importance.

Bibliographie.

- 1) Chatenay, Les réactions leucocytaires vis-à-vis certaines toxines végétales et animales. (Thèse de Paris. 1894.)
- 2) Nicolas et Courmont, Étude sur la leucocytose dans l'intoxication expérimentale par la toxine diphtérique. (Arch. de Med. Exp. et d'Anat. 1897.)
- 3) Bésredka, De la leucocytose dans la diphtérie. (Annales de l'Inst. Pasteur. 1898. No. 5.)
- 4) Nicolas, Courmont et Prat, Sur la leucocytose totale et polynucléaire dans l'immunisation expérimentale par la toxine diphtérique. (Journ. de phys. et path. gén. Paris 1900. No. 6. Novembre.)
- 5) Zargaroff, Krowianaja reakcia pri eksperimentalnom stolbniakie. (Thèse de St. Petersb. 1899.)
- 6) Werigo, Les globules blancs comme protecteurs du sang. (Annales de l'Inst. Pasteur. 1892.)
- 7) Bianchi-Mariotti, Wirkung der löslichen Produkte der Mikroorganismen auf die Isotonie und Hämoglobingehalt des Blutes. (Wiener med. Presse. 1894. No. 36.)
- 8) Butiagin, Ob izmienienach krowi u loszadie, immuniziruiemych protiw difterii. (Thèse de Tomsk. 1901.)
- 9) Pitkianien, Materialy k morfologii krowi pri difterii. (Thèse de St. Petersb. 1900.)
- 10) Gundobin, Kliniczeskoie znaczenie leukocytoza pri difterii. (Bol. Gaz. Bot. 1897.)

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einsendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabsätze direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Inhalt.

- | | |
|---|---|
| <p>Bertarelli, E., Untersuchungen und Beobachtungen über die Biologie und Pathogenität des <i>Bacillus prodigiosus</i>. (Schluß), p. 312.</p> <p>Bonhoff, H., Studien über den Vaccinereger. I. (Schluß), p. 336.</p> <p>Carega, Alessandro, Ueber die aktiven Substanzen des <i>B. coli</i>, p. 323.</p> <p>v. Dungern, Frhr., Bindungsverhältnisse bei der Präzipitinreaktion, p. 355.</p> <p>Galli-Valerio, Bruno, Sur un cas d'appendicite avec <i>Oxyuris vermicularis</i> L. et <i>Trichocephalus trichiurus</i> L., p. 350.</p> | <p>Ghon, Anton u. Sachs, Milan, Beiträge zur Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen, p. 289.</p> <p>Kucharszewski, Henri, De l'influence des toxines diphtérique et tétanique sur l'hémoglobine la morphologie et le poids spécifique du sang, p. 381.</p> <p>Maggiora, A. u. Valenti, G. L., Ueber eine infektiöse Krankheit beim Genus <i>Turdus</i>, p. 326.</p> |
|---|---|

Nachdruck verboten.

Beitrag zum Studium des Dysenteriebacillus.

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des k. und k. Militär-sanitätskomitees. Vorstand: Stabsarzt Dr. L. Kamen.]

Von Dr. **Robert Doerr**, Regimentsarzt.

Mit 1 Tafel.

Shiga war der erste, der 1898 bei der nicht durch Amöben erzeugten Form der Dysenterie einen Bacillus der Typhus-Coli-Gruppe in den Faeces nachwies, der ihm hinreichend charakterisiert schien, um seine Auffassung als eigene Species und seine Abtrennung von den zahlreichen verwandten Arten dieser Gruppe zu rechtfertigen. Seine Resultate haben alsbald eine ganze Reihe von Autoren bestätigt (Flexner, Kruse, Vedder und Duval, Curry, Th. Müller, Spronck, Strong, Deycke, v. Drigalski etc.) und da ihre Untersuchungen in verschiedenen Ländern ausgeführt waren, gewann es den Anschein, als ob nun auch die so lange dunkle Aetiologie der epidemischen, nicht durch Amöben verursachten Dysenterie eine erfreuliche Klärung erfahren würde. Es hat auch keiner der genannten Forscher gezögert, die von ihm gezüchteten Bakterien als Erreger der Dysenterie zu bezeichnen.

Als Beweis für diese Auffassung von der Bedeutung der Shiga-schen Entdeckung konnte zunächst eben die Konstanz des Auftretens des fraglichen Dysenteriebacillus bei Epidemien in den verschiedenartigsten Distrikten dienen, natürlich unter der Voraussetzung, daß die von den verschiedenen Autoren gezüchteten Stämme bei einer vergleichenden Prüfung sich als identisch oder wenigstens als Rassen einer Art erwiesen. Dieser Punkt mußte zunächst bewiesen werden und war auch bald Objekt der Kontroverse.

Der Streit, ob Shigas und Kruses Bacillen auf Grund der verschiedenen Beweglichkeit und des verschiedenen Aussehens der Kolonien auf Gelatineplatten als verschieden anzusehen sind, ist heute erledigt. Shiga hat seine Behauptung, daß die von ihm kultivierte Art beweglich sei, gestützt auf die Beobachtung im hängenden Tropfen, die in zweifelhaften Fällen dem subjektiven Ermessen zu viel Spielraum gewährt, um sichere Resultate zu ergeben, und auf den Befund eines einzigen begeißelten Individuums, das offenbar aus dem zur Emulgierung der Agarkultur verwendeten nicht sterilen Wasser stammte; Zetnow, der diesen Versuchsfehler eliminierte und der in der Technik der Geißeltinktion Meister ist, hatte nur negative Ergebnisse sowohl mit Shigas Stamm als auch mit den von Flexner kultivierten Bacillen, der gleichfalls bei Anwendung der Methode nach van Ermenghem polständige Geißeln bei einigen Individuen nachgewiesen haben wollte. Das differente Aussehen der Gelatineplattenkolonien hat Shiga selbst mit der Zusammensetzung des von ihm verwendeten Nährbodens erklärt und konnte er auf höherprozentiger Gelatine dasselbe weinblattartige Oberflächenwachstum erzielen wie Kruse.

Dann haben die deutschen Bakteriologen anläßlich der Döberitzer Epidemie ihre Stämme und die von Flexner, Kruse, Shiga mit-

einander verglichen, das Fehlen der Geißeln und der Beweglichkeit festgestellt; doch haben wieder abweichende Resultate bei den Agglutinationsversuchen mit Ruhrrekonvaleszentenserum sie veranlaßt, an der Identität des Flexnerschen Stammes mit den übrigen zu zweifeln. Die Auf-
findung anderer Bakterienrassen, die nicht nur eine weitgehende morphologische und kulturelle Aehnlichkeit mit den ursprünglichen Ruhrbacillen zeigten, sondern auch durch Ruhrrekonvaleszentensera in höherer Verdünnung (1:100) agglutiniert wurden, trotzdem sie gar nicht aus Ruhrstühlen stammten, hat schließlich die Frage nach einem sicheren Kriterium zur Beurteilung der Identität der verschiedenen Stämme zu einer akuten gemacht, und es ist das Verdienst von Martini und Lentz, gezeigt zu haben, daß nur die Agglutination, und zwar die makroskopische, mittelst hochwertiger künstlicher Immunsera herangezogen werden kann zur Entscheidung dieser Frage, indem der Pfeiffersche Versuch, welcher für die Agnoszierung echter Typhusbacillen so wertvolle Dienste leistet, bei den Ruhrstäbchen unanwendbar ist; sie sind stark toxisch, verleihen aber dem Serum nur wenig bakterizide Kraft.

Sie prüften also mit einem Serum, daß sie durch Immunisierung einer Ziege mit dem Stamme Shiga erhalten hatten und fanden, daß dieser Stamm, sowie die von Kruse, Müller, Flexner (New-Haven) und die Döberitzer in derselben Verdünnung agglutiniert wurden (1:400 bis 500) somit artgleich seien, daß dagegen von Deycke in Konstantinopel und von Flexner und Strong in Manila gezüchtete Bacillen von der Shiga-Gruppe abzutrennen wären. Lentz hat überdies noch bei der Prüfung des Verhaltens der Bacillen in Stichkulturen, welche in Kombination von Lakmusagar mit verschiedenen Zuckerarten angelegt wurden, eruiert, daß das Aussehen der Stichkultur in Lakmusmannitagar eine Unterscheidung ermöglicht zwischen den Bacillen der Shiga-Gruppe einerseits, deren Zusammengehörigkeit, wie erwähnt, schon vorher durch ihn und Martini mittelst Agglutination durch hochwertige aktive Immunsera ermittelt worden war, und den anderen Ruhrstäbchen und ruhrähnlichen (pseudodysenterischen) Bacillen andererseits. Dieses Kriterium, das eigentlich nur eine Modifikation des v. Drigalskischen Typhusnährbodens bildet, der sich in dieser Hinsicht als unzulänglich erwiesen hatte, würde also in zweiter Linie bei der Identifizierung von Ruhrstäbchen in Betracht kommen. Das Verhalten in der Barsiekowschen Nutrose-Laktose-Lakmuslösung reicht, wie wir sehen werden, hierzu nicht aus; wohl aber war bisher dieser Nährboden gut verwendbar, um dort, wo ein entsprechendes Immunserum nicht zur Hand ist, rasch die Ueberzeugung zu verschaffen, daß man es nicht mit Typhusbacillen oder Coli-Varietäten (*Bac. coli anaërogenes* Lembke) zu tun hat.

Wir stehen also heute auf dem Standpunkte, daß nur die Befunde Shigas, Kruses, Flexners in Nordamerika, Müllers, und die bei der Döberitzer Epidemie, also sämtliche in der nördlichen gemäßigten Zone erhobenen, für die Konstanz des Auftretens der fraglichen Ruhrerreger zu verwerten sind, und daß die anderen in dieser Hinsicht nicht mehr in Betracht kommen. Und gerade das konstante Auftreten bei Ruhrepidemieen bildet, wie gleich erörtert werden soll, das wichtigste Beweismittel für die ätiologische Bedeutung der Shigaschen Stäbchen. So zögere ich nicht, die veröffentlichten gültigen Befunde um einen neuen zu vermehren, um so mehr, als meine Untersuchungen sich auf eine größere Epidemie in Oesterreich erstrecken, für welches Territorium

bisher nur P. Th. Müller an 3 Fällen einer Epidemie in Südsteiermark positive Resultate erhalten konnte.

Bevor ich aber an die Darlegung meiner eigenen Untersuchungsergebnisse schreite, möchte ich noch die übrigen Argumente, welche außer der Konstanz des Vorkommens für die ätiologische Bedeutung des Bacillus dysenteriae Shiga herangezogen werden können, einer Kritik unterziehen. Es ist ja kaum notwendig, nochmals zu betonen, daß das Agglutinationsverfahren nach Kolle und Martini und der Lentz'sche Lakmusmannitagar nur verwendet werden können zum Nachweis, daß ein neugezüchteter Stamm mit dem Shiga-Bacillus identisch ist; über die Bedeutung dieses Bacillus für das Zustandekommen des dysenterischen Prozesses im Darm sagen sie uns natürlich nichts.

Die Entscheidung dieser Frage würde auf wenig Schwierigkeiten stoßen, wenn es sich bei den Ruhrstäbchen um morphologisch und kulturell scharf charakterisierte Mikroorganismen handeln würde, die bei Tieren dysenterieähnliche Prozesse im Darm hervorrufen können. Das ist aber in keiner Weise der Fall. Dieser Bacillus ist ein Glied der artenreichen Typhus-Coli-Gruppe; sein rascheres Wachstum auf Gelatine läßt ihn mehr dem Colibacillus, die fehlende Gas- und Indolbildung und Milchgerinnung, der Grad der Säureproduktion in Lakmusmolke, das Wachstum auf Kartoffeln, in Neutralrotagar dem Typhusbacillus verwandt erscheinen. Von beiden unterscheidet ihn das Fehlen von Geißeln, das Verhalten in Lakmusmannitagar, in Barsiekowscher Nährflüssigkeit. Damit wäre eine Abgrenzung gegenüber diesen beiden Arten in morphologisch-kultureller Beziehung gegeben. Aber wir kennen heute eine ganze Menge von Arten, welche alle in diese Gruppe gehören und denen gegenüber die Differenzierung keine so leichte ist. Es gibt unbewegliche Coli-Arten, Coli-ähnliche Species, die kein Gas bilden (*B. coli anaërogenes*) und den Rothbergerschen Nährboden nicht verändern, und schließlich die von Kruse bei nicht epidemischer Dysenterie (Ruhr der Irren) und von Lentz und anderen kultivierten Pseudodysenteriestämme, die sämtlich weitgehende Aehnlichkeiten mit dem Shigaschen Bacillus zeigen. Es weiß jeder, der Coli-ähnliche Arten nicht nur aus Faeces, sondern aus verschiedenen anderen Substraten (Bodenstaub, Wasser etc.) gezüchtet und ihre Eigenschaften geprüft hat, daß sich hier fließende Uebergänge in morphologisch-kultureller Beziehung konstatieren lassen.

Ist ja doch die Frage, ob die beiden Arten: Typhusbacillus und das typische *Bacterium coli commune*, die am stärksten voneinander differieren und gewissermaßen die Endglieder der ganzen Reihe repräsentieren, tatsächlich verschieden sind, von den französischen Bakteriologen noch immer nicht bejaht, und Rémy hat erst neuerlich behauptet, daß ihm durch Symbiose beider Arten Umzüchtungen gelungen seien. Auch die sogenannten Aërogenes-Arten sehen viele nur als Coli-Varietäten an. So herrscht gerade in dieser Gruppe eine Unsicherheit in der Auffassung des Artbegriffes und eine weitgehende Verschiedenheit der Ansichten. Unter diesen Verhältnissen wird eine gewisse Skepsis am Platze sein, wenn bei einer infektiösen Darmerkrankung die Isolierung eines neuen Coli-ähnlichen Bakteriums gelingt.

Auch mit der Tierpathogenität verhält es sich bei den Shigaschen Stäbchen eigentümlich; sie sind nur eminent toxisch; zur Erzeugung septikämischer Prozesse mit massenhaftem Auftreten der Bacillen im Blute sind selbst bei kleinen Versuchstieren (weißen Mäusen) relativ

große Mengen frisch gezüchteten, also jedenfalls noch virulenten Bakterienmaterials erforderlich. Die Erzeugung dysenterischer Prozesse gelingt nicht, wie sehr man auch das Versuchstier und den Einverleibungsmodus variiert. Wir können hier nicht die Analogie mit den Erregern anderer infektiöser Darmerkrankungen (Typhus und Cholera) heranziehen, die auch beim Tiere nicht ohne weiteres in der Weise pathogen wirken, daß sie die gleichen pathologisch-anatomischen Veränderungen im Intestinaltrakt erzeugen wie beim Menschen, denn einerseits gelingt dies doch durch Wahl geeigneter Versuchsbedingungen (junger Tiere etc.), und ferner ist es auffällig, daß für die andere Form der Dysenterie, welche durch Amöben erzeugt wird, die Katze so empfänglich ist, während sie sich, auch bei Applikationen per rectum, dem Shiga-Bacillus gegenüber ganz refraktär erweist.

Für die ätiologische Bedeutung des *Bacillus dysenteriae* Shiga würde höchstens ein anderes Moment sprechen: die Agglutination durch Ruhrrekonvaleszenten Serum.

Nun werden ja aber auch andere (ruhrähnliche) Bacillen (Barabinow, Pseudodysenterie Lentz, Pseudodysenterie I, II, III) selbst in stärkeren Verdünnungen (1:150) durch solche Sera, die von zweifellosen Ruhrfällen stammen, agglutiniert, während der Agglutinationstitre für echte Ruhrbacillen oder unpräjudizierlich gesprochen, für den *Bacillus Shiga* resp. die mit ihm heute identischen Stämme oft viel niedriger liegt. Allerdings werden die pseudodysenterischen Stämme sowie die von Flexner und Strong auch von Seris (bei Verdünnungen bis 1:60) beeinflusst, die gar nicht von Ruhrstühlen stammen, sondern z. B. von an tuberkulösen Darmgeschwüren erkrankten Individuen, sie scheinen also überhaupt eine Tendenz zur Agglutination durch menschliche Sera zu besitzen, während für die Shigaschen Stäbchen bisher etwas derartiges noch nicht bekannt ist. Ich habe eine Reihe von Seris untersucht, die zum Teil von Gesunden, die nie an Ruhr gelitten hatten, zum Teil von Patienten stammten, welche an den verschiedenartigsten Affektionen des Magendarmtraktes erkrankt waren, und erhielt bei Verdünnungen über 1:10 niemals Agglutination, weder bei den im Institute isolierten Stämmen, noch bei Kruse oder Müller. Diese Resultate sind um so wertvoller, als sie sich nicht nur in voller Uebereinstimmung mit den Befunden Müllers und Kruses befinden, sondern auch mit denen von Martini und Lentz, soweit dies aus ihrer Tabelle III zu ersehen ist, die mit der Methode von Kolle und Martini gearbeitet und die aus der Beobachtung im hängenden Tropfen sich ergebenden Fehlerquellen vermieden haben. Müssen wir also anerkennen, daß bei von so vielen Seiten an einer großen Zahl von Fällen und nach verschiedenen Methoden ausgeführten Versuchen kein einziger Fall bekannt geworden ist, in dem ein Serum, das nicht von einem Ruhrfalle stammte, in höherer Verdünnung (1:50) die Bacillen der Shigaschen Gruppe agglutiniert hat, so werden wir die positiven Ergebnisse, wo Ruhrsera noch bei Verdünnungen von 1:600 und darüber auf echte Dysenteriebacillen sich wirksam erwiesen, nicht als vollkommen belanglos für die Frage nach dem Kausalnexus der Stäbchen mit dem Ruhrprozeß ansehen können. Das war ja auch schließlich der Weg, auf dem Shiga, Kruse und ihre zahlreichen Nachfolger dazu gelangt sind, für ihre Stämme den Titel „Dysenteriebacillus“ zu reklamieren.

Doch scheint es, als ob auch dieser Punkt leicht überschätzt werden kann. Die Dysenterie ist eine Krankheit des Darmes, und wir wissen

heute aus den Untersuchungen Escherichs und seiner Schule, daß bei verschiedenen Darmerkrankungen das Serum des Patienten bedeutende agglutinatorische Kraft für die Coli-Rassen gewinnt, welche zur Zeit der Erkrankung die Darmflora konstituieren. Daraus kann man, wenn man will, folgern, daß die im Darm als harmlose Saprophyten lebenden Coli-Varietäten plötzlich pathogen geworden sind, oder daß neue bösartige Coli-Rassen das Darmlumen bevölkern. Aber man ist durch nichts von dieser Schlußfolgerung gedrängt. Bei der Diphtherie gewinnt gleichfalls das Blutserum unter Umständen Agglutinationswirkung für Streptokokken und es fällt deswegen niemand ein, am Löfflerschen Bacillus zu zweifeln; beim Scharlach, dessen Erreger nicht bekannt sind, weil sie sowie die Noxen der anderen exanthematischen Krankheiten sich gegenüber unseren Forschungsmethoden als resistent erweisen, hat man von verschiedenen Seiten bereits die Streptokokken, die aus Scarlatinafällen gezüchtet sind und durch Scharlachserum beeinflußt werden, zu Scharlacherregern gestempelt. Es könnte leicht der Fall eintreten, daß die Verhältnisse bei der Ruhr ähnlich liegen, und daß sich später der Schluß, den man von der Tatsache der Agglutination der Ruhrbacillen durch Ruhrserum auf ihre krankheits-erregende Wirkung macht, als voreilig erweist.

Immerhin haben wir vorläufig die Berechtigung, an der Pathogenität der Shigaschen Stäbchen festzuhalten, solange sie nicht mit allen ihren Eigenschaften (einschließlich Agglutinierbarkeit durch hochwertige Immunsere in höheren Verdünnungen) bei anderen Prozessen oder bei Gesunden im Darminhalte nachgewiesen werden, und je zahlreicher andererseits die positiven Befunde bei Ruhrepidemien werden.

Die Epidemie, welche ich zu beobachten Gelegenheit hatte, umfaßte 118 Fälle und herrschte während der Monate Juli bis September 1902 in dem Militärlager in Bruck a. L., an der österr.-ungar. Grenze, welches schon zu wiederholten Malen von Dysenterie heimgesucht wurde. Abgesehen von alljährlich auftretenden sporadischen Fällen, gewann die Krankheit das letzte Mal im Jahre 1898, eine größere Ausbreitung. Damals gelang es auch, die Quelle der auf das Lager beschränkten Epidemie zu ermitteln.

Das Wasser wird einem Teil des Lagers durch eine Wasserleitung zugeführt, deren Quellstube $\frac{1}{4}$ Stunde weit entfernt ist und im Jahre 1898 noch jedermann zugänglich war. Es konnte nun eruiert werden, daß vorüberziehende Zigeuner, deren Kinder an Diarrhöen litten (ob an typischer Dysenterie, war nicht mit Sicherheit festzustellen, ist jedoch angesichts der zu erörternden Verhältnisse in diesem Falle nicht zu bezweifeln), das Wasser der Quellstube dadurch verunreinigt hatten, daß sie die Kinder darin badeten; wenige Tage nachher traten in dem mit Leitungswasser versorgten Lagerterritorium die ersten Dysenteriefälle auf, und gleichzeitig erkrankten auch Arbeiter, welche in einem Steinbruch in der Nähe der Quellstube beschäftigt waren und das Trinkwasser aus derselben schöpften. In dem mit Brunnen versehenen Lageranteil blieb die Mannschaft gesund. Es wurden damals, weil diese Tatsache der Verunreinigung der Quellstube noch unbekannt war, die Durchseuchung des mangelhaft kanalisiertens Bodens und die infizierte Beschaffenheit des Grundwassers, welches im ganzen Lager als Nutzwasser benutzt wurde, als Ursache der Epidemie angesehen, die Nutzwasserbrunnen gesperrt, und in das Lagerspital, in welchem bislang Brunnenwasser getrunken wurde, Leitungswasser eingeleitet. Kurze

Zeit darauf traten unter den im Lagerspital untergebrachten Sanitäts-soldaten, die bisher gesund geblieben waren, die ersten Dysenteriefälle auf. Als man die wahre Sachlage erkannt hatte, wurde die Wasserleitung gesperrt und anderes Trinkwasser zugeführt; im unmittelbaren Anschluß an diese Maßregel erlosch auch die Epidemie.

1902 lagen die Verhältnisse anders. Quellstube und Leitung waren in einem den hygienischen Forderungen vollkommen entsprechenden Zustande. Auch korrespondierte die Verteilung der Fälle auf die einzelnen Ubikationen nicht mit der Versorgung mit Leitungswasser. Dementsprechend ergab auch die an Ort und Stelle ausgeführte Wasseruntersuchung, in welcher auf das Auftreten Coli-ähnlicher Kolonien besonderes Augenmerk gerichtet worden war, ein negatives Resultat, trotzdem über 60 Platten von an verschiedenen Stellen der Leitung entnommenen Wasserproben gegossen worden waren; dabei wurde die Untersuchung durchgeführt, während die Epidemie ihren Höhepunkt erreicht hatte. Auch die Untersuchung einiger Nutzwasserbrunnen lieferte ein negatives Ergebnis. Die Epidemie war diesmal durch einen Truppenkörper eingeschleppt worden, der aus dem verseuchten Wiener Neustadt zu transferiert worden war, und bei dem einen Tag nach seiner Ankunft im Lager die ersten Fälle konstatiert wurden. Auch die Art, wie sich die Epidemie von der Baracke, in welcher dieser erstinfizierte Truppenteil einquartiert war, radiär ausbreitete, und die zeitliche Aufeinanderfolge der Fälle, machte es klar, daß es sich hier um Weiterverbreitung durch Kontaktinfektion und nicht durch infiziertes Trinkwasser handeln müsse.

Es bildete übrigens diese Epidemie gewissermaßen nur einen Teil einer großen, über ganz Niederösterreich ausgedehnten Epidemie. Dementsprechend erkrankten auch andere Truppenkörper. So ein kleines, in einer Wiener Kavalleriekaserne untergebrachtes Detachement (18 Fälle).

Hier konnte im Wasser gewiß die Entstehungsursache nicht gesucht werden, da die Mannschaft nur das Wasser der Wiener Hochquellenleitung verwendete. Auch unter der Civilbevölkerung Niederösterreichs traten zahlreiche Fälle auf, die aber wohl nur zum geringen Teile zur Kenntnis der Behörde gelangten. In der Umgebung der oben erwähnten Kavalleriekaserne in Wien z. B. waren zahlreiche Civilpersonen erkrankt, darunter ein Knabe, der in Spitalsbehandlung kam. Dort wurde die Diagnose Colitis gestellt. Ich schöpfte aus dem Umstande, daß die Wohnung des Knaben in der Nähe der Kaserne lag, in der Dysenterie herrschte, sofort den Verdacht, es könnte sich auch hier um diese Erkrankung handeln und fand tatsächlich meine Vermutung durch das klinische Bild und die bedeutende agglutinatorische Kraft des Serums dieses Patienten für Ruhrstäbchen bestätigt. Ebenso bestanden kleine Epidemien in Neulengbach (Innsbruck) und Klosterneuburg.

Im ganzen hatte die Epidemie einen leichten Charakter. Unter den 118 Erkrankungen in Bruck trat nur ein Todesfall ein, unter den Wiener Fällen keiner. Schwere Komplikationen waren gleichfalls selten, nur 6mal wurden Polyarthritiden und ebenso oft schwere Konjunktivitiden mit Keratitis, Iridocyclitis beobachtet, nur in einem einzigen Falle entwickelte sich ein Leberabsceß.

Die Stuhluntersuchungen stellte ich an 15 Fällen in Bruck, an 5 in Wien an. Eine größere Anzahl zu untersuchen war mir aus äußeren Gründen unmöglich. Von diesen gelang es in 7 Fällen aus Bruck, in einem aus Wien die Ruhrbacillen nachzuweisen. Dieser geringe Prozentsatz der positiven Ergebnisse hat seinen Grund darin, daß man nur dann

im Stande ist, die Shiga'schen Stäbchen mit Hilfe der gewöhnlichen Methoden aus dem Stuhle zu züchten, wenn man in den ersten Krankheitstagen untersucht, solange der Stuhl noch eine schleimige, schleimig-blutige oder schleimig-eitrige Beschaffenheit besitzt und geruchlos ist (bis zum 6. Tage). Sind die Entleerungen braun gefärbt, riechen sie fäkulent, so gelingt der Nachweis der Ruhrstäbchen in der Regel nicht mehr.

Es mag sein, daß die Anwendung der Drigalski-Conradischen Lackmus-Laktose-Agarplatten oder des Lenz'schen Nährbodens in solchen Fällen noch zum Ziele führt. Ich habe das Verfahren nur 3mal benutzt und damit jedesmal reussiert, darunter einmal, als ich von Gelatineplatten keine Ruhrstäbchen, sondern nur Coli-Arten erhalten konnte. In diesem Falle war auch der untersuchte Stuhl bereits gallig gefärbt und von fäkulentem Geruch. Untersucht man aber zur richtigen Zeit, so leisten die Gelatineplatten denselben Dienst, weil entweder die Dysenteriebacillen in Reinkultur wachsen, oder falls einzelne Coli-Kolonien aufgehen, diese durch ihr bedeutendere Größe, ihre geringere Transparenz etc. hinreichend von den Ruhrkolonien sich abheben.

Anders liegt die Sache beim Typhus, wo neben dem Krankheitserreger stets noch eine reiche Bakterienflora in den Faeces vorhanden ist, welche die Untersuchung auf Gelatineplatten, oft auch schon durch Verflüssigung stört. Hier hat außerdem das Untersuchungsergebnis einen höheren diagnostischen Wert, was bei dem ausgeprägten klinischen Bild der Ruhr nicht der Fall ist. Man kann also die Fälle zur Untersuchung wählen und den Drigalski'schen oder Lenz'schen Nährboden, deren Herstellung nicht gerade einfach ist, vermeiden, wenn man nicht gerade ermitteln will, bis zu welchem Zeitpunkte der Krankheit der Bacillus sich in den Faeces überhaupt nachweisen läßt.

Geeignete Stühle bieten auch mikroskopisch im gefärbten Deckglaspräparat ein charakteristisches Aussehen. Neben den zahlreichen Eiterzellen finden sich nur sehr wenige gramnegative Stäbchen vom Aussehen der Colibacillen, so spärlich, daß man häufig mehrere Gesichtsfelder durchsehen muß, um vereinzelte Exemplare zu sehen. Die so mannigfache Bakterienflora normaler und pathologischer Stühle ist vollständig verschwunden und erscheint erst nach Ablauf der ersten 5-6 Krankheitstage und der Wiederkehr der galligen Färbung und des fäkulenten Geruches.

Diese auffallende Keimarmut typischer dysenterischer Stühle hat bereits Kruse beschrieben und v. Drigalski versucht, dieselbe in der Weise zu erklären, daß durch die reichlichen Absonderungen die auf und in der Darmwand vegetierenden Bakterien gewissermaßen eine starke Verdünnung erfahren. Dieser Erklärungsversuch scheint nicht sehr glücklich zu sein. Bei der Cholera sind die Entleerungen viel kopiöser und zeigen durchaus keine Abnahme des Keimgehaltes. Daß in späteren Stadien, wenn in der Darmschleimhaut sich bereits ulceröse Prozesse etabliert haben, die Dysenteriebacillen zurückgedrängt und von anderen Bakterien überwuchert werden, ist leicht verständlich und steht durchaus im Einklang mit unseren Erfahrungen bei anderen infektiösen Darmerkrankungen (Typhus, Cholera).

Das Aussehen der Kolonien auf der Gelatineplatte ist nicht immer dasselbe. Schon Shiga hat, wie bereits erwähnt, ursprünglich seine oberflächlichen Kolonien als nicht charakteristisch bezeichnet und ist erst durch Verwendung anderer Gelatine (von höheren Prozentgehalt)

in der Lage gewesen, ein dem Kruseschen Bacillus ähnliches Wachstum zu erzielen. Aber auch auf derselben Gelatine weichen die einzelnen Varietäten (Kruse, Müller, meine Stämme) voneinander ab. Nach 2mal 24 Stunden hatten die oberflächlichen Kolonien 2 mm im Durchmesser, waren bläulich-weiß, durchscheinend, unregelmäßig weinblattähnlich umrandet. Der Rand erscheint unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung (Ok. 4 Obj. 2 Reichert) farblos, fast homogen, von Furchen durchzogen, welche blattrippenartig der exzentrisch gelegenen Durchbruchsstelle der Kolonie zustreben. Das Zentrum ist hellgelblich, gegen den Nabel zu mehr bräunlichgelb. Das radiäre Furchensystem ist nun sehr verschieden ausgeprägt.

Am deutlichsten, ja ausgeprägter als selbst bei Typhuskolonien ist es entschieden beim Kruseschen Stamme, und während es bei den ersteren allmählich mit zunehmender Opazität der Kolonie undeutlicher wird, bleibt es bei letzterem mehrere Tage hindurch gleich deutlich erhalten, der Rand ist lange Zeit homogen, farblos. Auch sind die Furchen tiefer, schon makroskopisch als feine Fältelung der Oberfläche der Kolonie wahrnehmbar. Der Müllersche Stamm zeigt ein gleiches Verhalten wie Typhus; die Stämme aus Bruck und Wien gleichen infolge ihrer etwas weniger ausgeprägten Furchen mehr dem Verhalten von typischem Bact. Coli. Die Furchen werden rasch undeutlich, nur mehr in den Randpartien erhalten, und diese letzteren werden gelblich und verlieren die homogene Beschaffenheit. Ich habe diese Verhältnisse durch eine beigegebene Tafel illustriert, welche ich der Güte meines verehrten Chefs Herrn St. A. Dr. L. Kamen verdanke; zur Statuierung von Arten reichen natürlich solche Unterschiede nicht aus, indem man ja oft auch auf mit Reinkulturen von Cholera u. a. gegossenen Platten sehr verschiedenen Formen von Oberflächenkolonien begegnet. Zudem finden wir auch bei dem den gesunden Darm des erwachsenen Menschen bewohnenden Bakterium - Coli zwei Rassen, von welchen die eine auf Gelatine transparent, die andere mehr opak wächst; hier haben wir es gewiß nicht mit zwei verschiedenen Arten zu tun, da es wiederholt schon gelang, durch verschiedene Mittel die eine Varietät in die andere überzuführen. So hat Morrel bei Passage durch den Tierkörper vermocht, bei der opaken Art transparente Gelatinekulturen zu erzielen. Ich erwähne diesen Umstand besonders, weil ich über etwas ähnliches bei meinen Stämmen berichten kann. Bei den Versuchen, durch Immunisierung mit einem derselben ein hochwertiges Serum zu erzeugen, ging das Versuchstier ein und die aus dem Infiltrat an der Injektionsstelle angelegten Gelatineplatten wiesen Oberflächenkolonien auf, die in nichts sich von dem Müllerschen und nur wenig von den Kruseschen Bacillen unterschieden. Auch mehrmonatliche Fortzüchtung im Laboratorium bewirkte eine Annäherung an den Wachstumstypus des Kruseschen Stammes. Die Kolonien wachsen später bedeutend und werden auf nicht zu dicht besäten Platten um ein Mehrfaches größer als Typhuskolonien, nähern sich also in dieser Hinsicht mehr dem B. coli. Die tiefen Ansiedelungen sind charakteristisch, scharf umrandet, kreisrund, gelblich, später bräunlichgelb und sehr fein granuliert.

Auf schrägem Agar entstehen graue transparente Ueberzüge, welche einen deutlich hervortretenden spermaähnlichen Geruch verbreiten, den man jedoch auch bei anderen Ruhrstämmen als bei denen der Shiga-Gruppe antrifft.

Bouillon wird diffus getrübt (nach 24 Stunden bei 37°) und klärt

sich später langsam von oben her, wobei ein spärliches, grauweißes Sediment entsteht; die Bildung einer Kahmhaut, wie sie bei manchen Colivarietäten eintritt, kann nie beobachtet werden; ebensowenig bilden sich Häufchen, wie sie in üppig wuchernden Coli-Kulturen oft schon nach 12 Stunden erscheinen können. Die Trübung ist stets geringer als bei gleichaltrigen Coli-Arten, mehr dem Typhus entsprechend. Eine besonders schnelle Klärung der Bouillon, wie sie Martini und Lentz bei den von Strong auf den Philippinen gezüchteten Stämmen sahen, verbunden mit langsamem Wachstum, findet man auch bei echten Ruhrbacillen z. B. bei Kruse. Mir stand eine vom Kralschen Laboratorium in Prag bezogene Kultur von Kruses Bacillen zur Verfügung, deren Reinheit wiederholt durch Plattenaussaat geprüft wurde; diese zeigte anfänglich das für den Stamm Strong beschriebene Verhalten in Bouillon, konnte aber leicht zu dem eben als typisch beschriebenen Verhalten gebracht werden, wenn man von Bouillon zu Bouillon übertrug und immer nur von der getrübbten Flüssigkeit abimpfte, ohne den getrübbten Bodensatz aufzuwirbeln. Indol wird in der Bouillon nicht gebildet, ebensowenig wie in 1% Pepton-NaCl-Lösung selbst nach mehreren Tagen. Ein Stamm Flexner (gleichfalls aus Krals Laboratorium bezogen und nach allem wohl einer jener Stämme, die nicht zur Shiga-Gruppe gerechnet werden können) bildete zwar nicht in Bouillon, wohl aber in Peptonlösung nach mehreren Tagen Indol.

Milch wird selbst nach 8 Tagen nicht koaguliert.

Das Wachstum auf Kartoffeln gleicht dem einer zum Vergleich herangezogenen Ty-Kultur, doch ist das Wachstum bei den Ruhrbacillen mehr auf den Impfstich beschränkt und nicht über die Oberfläche der Kartoffel ausgebreitet.

Die Petruschky'sche Lakmusmolke (bezogen von Dr. Grübler) bleibt fast klar, so wie bei Typhus, und wird schwach sauer; doch kann der Säuregrad immerhin etwas stärker werden als bei Typhus; so zeigte der Krusesche Stamm nach 4 Tagen (37°) einen Säuregrad von 6 Proz. $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge und in gleicher Weise verhielten sich im Mittel auch die Brucker Stämme.

In Stichkulturen von Traubenzuckeragar bleibt die Gasbildung aus; ebenso in mit Traubenzuckerbouillon gefülltem Gärungskölbchen; auch hier tritt oft sehr rasch eine Klärung der Nährflüssigkeit im anaëroben Schenkel ein, ein Verhalten, dem man bei Typhus oder beweglichen Coli-Arten nie begegnet und welches wohl auf das Fehlen der Beweglichkeit bezogen werden muß. Die Kombination von Traubenzuckeragar mit Neutralrot in Form des Rothbergerschen Nährbodens wird weder entfärbt noch bildet sich in den ersten 3—4 Tagen eine Fluoreszenz aus. Die Behauptung von Müller, daß bei echten Ruhrbacillen nach mehrtägigem Verweilen bei 37° überhaupt keine Fluoreszenz eintritt, während der *B. anaërogenes* Lembke oder ruhrähnliche Arten dem Agar eine schmutzigrüne Fluoreszenz verleihen, kann ich nicht bestätigen. Für Kruse und 3 unserer Stämme verhält sich die Sache allerdings so wie Müller angibt, aber Müllers Stämme¹⁾ selbst zeigen nach 8 Tagen eine leichte schmutzigrüne Fluoreszenz, und ebenso 5 von den 8 Stämmen, die im Institute gezüchtet wurden, während der Flexnersche von Král bezogene, der durch Indolbildung, durch gelbliche Farbe des

1) Die mir von Herrn Dozent Dr. R. Kraus in dankenswerter Weise überlassen wurden.

Kartoffelrasens, durch sein Verhalten in Lakmusmannitagar und sein Verhalten gegenüber Shiga-Immuneserum sich sicher verschieden von typischen Ruhrbacillen erwiesen hatte, sich so wie Typhus oder Kruse verhielt. Auch ein im Institute aus einem periproktalen Absceß kultivierter *B. anaërogenes coli* zeigte die schmutziggrüne Fluoreszenz nicht. Man wird also diesen geringen und erst nach mehrtägiger Beobachtung hervortretenden Unterschieden kaum eine differentialdiagnostische Bedeutung beimessen können; sie sind zu gering und vor allem inkonstant, vielleicht bedingt durch geringfügige Abweichungen in der Zusammensetzung des Nährsubstrates.

Wir können nur sagen, daß der Ruhrbacillus sich im Rothberger'schen Nährboden sowie in Lakmusmolke ähnlich verhält wie der Typhusbacillus. Viel mehr leistet die von Barsiekow angegebene Nährflüssigkeit, welche aus Nutrose 1,0, NaCl 0,5, Traubenzucker oder Milchzucker 1,0 und Aq. dest. ad 100,0 besteht. Wie Klopstock zuerst berichtet hat, treten in der Nutrose-Traubenzuckerlösung oder in einer Nutroselösung, welche 1 Proz. Traubenzucker + 1 Proz. Milchzucker enthält, deutliche Differenzen zu Tage zwischen Typhus-, Coli- und Ruhrbacillen. Die nur Laktose enthaltende Modifikation gestattet nur Coli von Typhus- oder Ruhrbacillen, nicht aber diese beiden letzteren voneinander zu trennen. Die Unterschiede bestehen bei Traubenzuckerzusatz darin, daß bei 37° Coli in längstens 24 Stunden eine fetzigflockige Gerinnung der Nutrose herbeiführt, während Typhusbacillen in gleichaltrigen Kulturen bloß eine starke milchige Trübung und erst nach weiteren 24 Stunden eine mehr gleichmäßige Fällung bewirken. Ruhrbacillen säuern das Nährsubstrat zum Unterschiede von *B. faecalis alcaligenes*, bewirken aber in den ersten Tagen überhaupt keine, und erst nach mehrtägigem Verweilen im Brutofen eine sehr schwache Fällung der Nutrose, die sich als geringe Trübung der Nährflüssigkeit zu erkennen gibt. Um die Säuerung sichtbar zu machen, setzt man zweckmäßig dem Nährsubstrat 3-proz. Lakmustinktur nach Kahlbaum zu. Es werden dann alle Röhrchen rot. In Typhus- und Coli-Kulturen wird aber die rote Lackmusfarbe durch die Koagula angezogen, die schön rosenrot tingiert sind, die übrige Flüssigkeit wird farblos und wasserklar; Ruhr Röhrchen bleiben diffus rötlich gefärbt. Füllt man die Flüssigkeit in Gärungskölbchen, so tritt bei Coli noch die Gasbildung hervor, so daß man sich das Aufstellen von Milchzucker-Nutroskulturen ersparen kann, wenn man etwa Typhus von Coli mit Hilfe der Reaktion trennen wollte. In letzterer Beziehung dürfte übrigens der neue Nährboden sich kaum einbürgern. So zeigen die Schottmüllerschen Paratyphuserreger das gleiche Verhalten wie Typhus, soweit sie zur Gruppe Müller gehören, während die Gruppe Seemann Gas bildet, also mehr dem *B. coli* sich nähert. Auch für Ruhrbacillen hat die Probe nur den Wert, daß sie mit einem jederzeit leicht herzustellenden und haltbaren Nährboden durchführbar ist; an Feinheit der Reaktion wird sie von der Lentz'schen Lakmusmannitagarprobe entschieden übertroffen. Denn sie ist nicht im stande, die Bacillen, welche mit dem Shigaschen identisch sind, von anderen ähnlichen abzutrennen, z. B. von dem schon mehrfach erwähnten von Král bezogenen Stamm Flexner, welcher als Stichkultur im Lentz'schen Mannitagar nach 24 Stunden bereits eine entschiedene Rötung des Nährsubstrates hervorrief, wenn auch nicht so intensiv wie Typhus; sich demnach deutlich von echten Ruhrbacillen unterschied, die, wie ich dies auch für alle

meine Stämme fand, den Nährboden in seiner Farbe nicht alterieren. In den Barsiekowschen Nutroselösungen waren solche Differenzen zwischen den Flexnerschen und echten Ruhrbacillen nicht vorhanden. Auch die Paratyphusarten zeigen im Lentz'schen Nährboden durch die Gasbildung beide ein vom Typhus abweichendes Verhalten.

Am zweckmäßigsten ist es, wenn man sich eines Nährbodens bedient, der die Vorzüge des Lentz'schen, insbesondere die sichere Differenzierung mit der leichten Herstellbarkeit und konstanten Zusammensetzung der Barsiekowschen Lösungen vereint; man stellt sich eine Flüssigkeit her, bestehend aus

1 g Mannit,
0,5 „ NaCl,
1 „ Nutrose,
100 ccm Aq. dest.

Die Lösung der Nutrose beschleunigt man durch Erwärmen im Wasserbade, darauf wird filtriert und dem Filtrate 3 ccm Lakmuslösung nach Kahlbaum hinzugefügt. Man verteilt die Flüssigkeit auf Eprovetten oder Gärungskölbchen und sterilisiert im strömenden Dampfe an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durch je 15 Minuten. In dieser Lösung erzeugen ruhrähnliche Bacillen (z. B. der Flexnersche Stamm) nach 24 Stunden deutliche Rotfärbung, die Stämme der Shiga-Gruppe lassen sie unverändert, genau so wie bei den Stichkulturen in Lackmusmannitagar, Typhus- und Coli-Stämme zeigen ein ähnliches Verhalten wie in der Traubenzucker-Nutroselösung, sind also untereinander und von Ruhr und ruhrähnlichen auf den ersten Blick zu unterscheiden.

Was die Tierpathogenität betrifft, so zeigte sich auch bei meinen Stämmen die außerordentliche Toxizität der Ruhrbacillen namentlich bei Kaninchen, wobei die abgetöteten (1 Stunde bei 65° C gehaltenen) Bakterien fast die nämliche Wirkung entfalteten wie die lebenden. $\frac{1}{4}$ Oese intravenös, $\frac{1}{2}$ Oese subkutan tötete Kaninchen von 2 $\frac{1}{2}$ —3 kg Gewicht in 48 Stunden bis 4 Tagen, wobei rapides Sinken des Körpergewichtes, Abnahme der Freßlust und Parese oder Paralyse der hinteren Extremitäten beobachtet wurde. Mäuse sterben bei intraperitonealer Injektion von $\frac{1}{4}$ Oese lebender Kultur nach 12—24 Stunden und zeigen dann eine beträchtliche Vermehrung der eingespritzten Bacillen im viscidem Peritonealsaft und im Saft der geschwollenen Milz, im Herzblute finden sich zahlreichere Bacillen nur dann, wenn man größere Mengen, etwa 1 Oese oder mehr, einspritzt.

Bei Injektion abgetöteter Kulturen ist der Sektionsbefund natürlich stets negativ. Die Milz ist kaum geschwollen, das Herz ist schlaff und strotzend mit Blut gefüllt. Die Pleuren hie und da mit Petechien bedeckt, das Herzblut und der Milzsaft sind steril. Spritzt man lebende Kultur intravenös ein, so lassen sich die Ruhrbacillen, wenn auch meistens nur kulturell, in der Milz nachweisen; das Herzblut ist auch in solchen Fällen steril. Natürlich erschwert diese Toxizität außerordentlich die Herstellung hochwertiger Sera bei kleinen Versuchstieren, wovon sich schon Müller bei Meerschweinchen überzeugt hatte. Unmöglich ist sie jedoch nicht, wenn man über die nötige Zeit und Geduld verfügt. Man muß mit sehr geringen Mengen (höchstens $\frac{1}{4}$ Oese abgetötet) beginnen und haben dann die Tiere die Reaktion, die sich im Sinken des Gewichtes und der Körpertemperatur, in Cyanose, Paralyse der hinteren Extremitäten oft sehr bedrohlich äußern kann, überstanden, so hat man, wenn man sich nur an die allgemeinen Regeln solcher Immunisierungsvorgänge

hält und allmählich mit den Dosen steigt, weiterhin nichts zu befürchten. Daß gerade die wiederholten Injektionen schlecht vertragen werden, kann ich wenigstens für Kaninchen und für die Kruseschen sowie die Brucker Stämme nicht bestätigen. Trotzdem ich die Immunisierung mit einem meiner Stämme sehr vorsichtig und erst durch 2 Monate fortgesetzt habe, bin ich doch bereits zu Seris gelangt, welche in Verdünnungen von 1:400 wirksam sind auf die Kulturen von Kruse, Müller und meine Stämme, während der Flexnersche Stamm und ebenso Typhus-, Coli- und Paratyphusbacillen noch in Verdünnungen von 1:10 nicht beeinflußt werden. Aehnlich verhielt sich das Resultat bei einer Gegenprüfung mit dem von Kaninchen gewonnenen Kruseschen Serum.

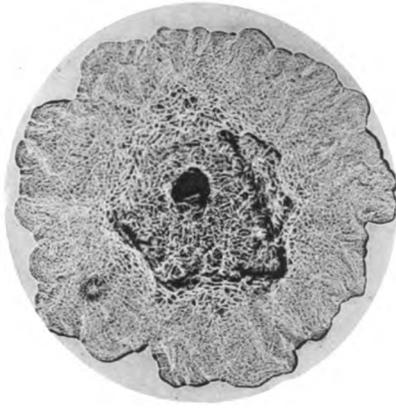
Um jedoch die Gewißheit zu erlangen, daß meine Stämme mit dem Shigaschen Bacillus identisch sind, schien es mir angezeigt, dieselben mit dem von Lentz gewonnenen Shiga-Ziegenimmenserum zu prüfen. Durch freundliche Vermittelung des Herrn Prof. Paltauf, wofür ihm auch hier bestens gedankt sei, hat Prof. Kolle die Liebenswürdigkeit gehabt, eine ausreichende Quantität dieses Serums vom Titre 1:2000 (bestimmt in Berlin) einzusenden. Die hier durchgeführte Untersuchung ergab für meine Stämme sowie für den Kruseschen und Müllerschen, welche ich in Händen hatte, den nämlichen Titre. Die Reaktion trat in den höheren Verdünnungen erst nach 2—3 Stunden ein, während bei niedrigeren Verdünnungen (bis 1:500) die Krümelbildung oft schon beim Herabfließen der emulgierten Kultur von der Eprouvettenwand in die Serumlösung bemerkbar war. Verschiedene Coli-Stämme, Paracoli-Bacillen (aus Wasser), Typhus- und Paratyphusbacillen sowie der von Králs Laboratorium bezogene Stamm Flexner blieben (letzgenannt in Verdünnungen über 1:50) unbeeinflußt. Als positiv wurde die Reaktion nur bezeichnet, wenn die Krümelbildung durch mindestens 5malige kräftige Schüttelstöße nicht wieder zum Verschwinden gebracht werden konnte.

Damit sind alle Zweifel an der Artgleichheit meiner Stämme mit den Shigaschen Bacillen und den verwandten Rassen behoben. Immerhin möchte ich nochmals betonen, daß dort, wo solche Sera oder die Mittel zur Bereitung des komplizierten Lentzschens Mannitagars nicht disponibel sind, die von mir verwendete Mannit-Nutrose-Lakmuslösung ebensolche Dienste leistet, die in 48 Stunden ohne besondere Schwierigkeiten hergestellt werden kann.

Meine Agglutinationsversuche mit Rekonvaleszentenseris und solchen von Kranken fielen sämtlich positiv aus (geprüft an 20 Seris aus Bruck, 8 aus Wien und 4 aus Csakathurn in Ungarn, wo gleichfalls eine kleine, von der niederösterreichischen unabhängige Epidemie herrschte). Der Titre war niemals niedriger als 1:50, in der Regel betrug er 1:200, 2mal 1:600, und schien mit der Schwere der Erkrankung und der Krankheitsdauer zu wachsen. Homologe Sera, d. h. solche, die von demselben Patienten stammten, aus dessen Faeces der Stamm gewonnen war, entfalten dagegen keine höhere Wirksamkeit auf denselben als auf andere Stämme und wirkten auch nicht stärker auf den homologen Stamm als andere Ruhrsera. Die Wirkung auf Müllers und Kruses Bacillen war stets ungefähr die gleiche wie auf meine Stämme.

Nur in einem Falle fiel die Agglutination sogar bei 1:10 negativ aus; der betreffende Patient litt an blutigen Diarrhöen und gehörte

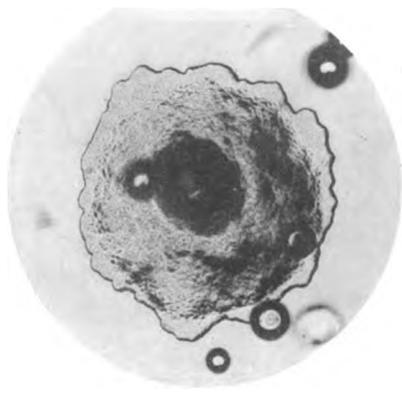
1
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000



1



2



3

einem verseuchten Truppenkörper an. Es stellte sich aber nachträglich heraus, daß seine Erkrankung im unmittelbaren Anschlusse an ein Trauma abdominis (Hufschlag) entstanden war; auch das klinische Bild wich völlig von dem der Ruhr ab (geringe Zahl der Stuhlentleerungen, Fehlen des Tenesmus, fäkulente Beschaffenheit der Faeces).

Schließlich erwähne ich noch, daß ich mehrfach Geißelfärbungen versucht habe sowohl mit Loefflers als auch van Ermengens Methode und nie ein positives Resultat erreichte, trotzdem die Geißeln bei Kontrollversuchen mit Typhus-, Coli- und Paratyphusstämmen sich stets leicht tingieren ließen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Chef, Herrn Stabsarzt Dr. Kamen für die Ueberlassung des Materiales und die Förderung meiner Arbeit meinen besten Dank abzustatten.

Erklärung der Tafel.

Fig. 1. Kruses Dysenteriebacillus. 4-tägige oberflächliche Kolonie auf leicht alkalischer 10-proz. Nährgelatine. Vergr. 20-fach.

Fig. 2. Gleichalterige, oberflächliche Kolonie eines Brucker Stammes in der 2. Generation.

Fig. 3. Gleichalterige Kolonie desselben Stammes nach mehrmonatlicher Fortzucht im Laboratorium.

Literatur.

- Beobachtungen und Untersuchungen über die Ruhr (Dysenterie). Die Ruhrepidemie auf dem Truppenübungsplatze Döberitz im Jahre 1901 und die Ruhr im ostasiatischen Expeditionskorps. (Veröffentl. a. d. Geb. d. Militärsanitätswesens. Heft 20.) Berlin (Aug. Hirschwald) 1902.
- Bowman, M. H., Dysenteric in the Philippines. (Journ. of trop. med. Vol. IV. No. 24. p. 420—422.)
- Curry, Dysenteric diseases of the Philippine islands with special reference to the amoeba coli as a causative agent in tropical dysentery. (Boston med. and surg. Journ. 1901. No. 8.)
- Deycke, Zur Aetologie der Dysenterie. (Dtsche med. Wochenschr. 1901. No. 1.)
- v. Drigalski u. Conradi, Verfahren zum Nachweise der Typhusbacillen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIX. p. 283 ff.)
- Flexner, S., A comparative study of dysenteric bacilli. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXX. 1901.)
- , The etiology of tropical dysentery. (Ibid. Bd. XXVIII. 1900 und Bull. of the John Hopkins Hosp.)
- Klopstock, M., Beitrag zur Differenzierung von Typhus-, Coli- und Ruhrbacillen. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 34.)
- Kruse, W., Ueber die Ruhr als Volkskrankheit und ihre Erreger. (Dtsche med. Wochenschr. 1900. No. 40. p. 637 ff.)
- , Weitere Untersuchungen über die Ruhr und die Ruhrbacillen. (Ibid. 1901. No. 23 u. 24.)
- , Der jetzige Stand der Dysenteriefrage. (Dtsche Aerzteztg. 1902. No. 2.)
- Lentz, O., Vergleichende kulturelle Untersuchungen über die Ruhrbacillen und ruhrähnlichen Bakterien nebst einigen Bemerkungen über den Lackmusfarbstoff. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLI. Heft 3.)
- , Dysenterie, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Jena (Fischer) 1902. Dasselbst ausführl. Literaturangaben.
- Markwald, Ein Fall von epidemischer Dysenterie beim Fötus. (Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 48.)
- Martini u. Lentz, O., Ueber die Differenzierung der Ruhrbacillen mittels der Agglutination. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLI. Heft 3.)
- Müller, P. Th., Ueber den bakteriologischen Befund bei einer Dysenterieepidemie in Südsteiermark. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXXI. 1902. No. 12. p. 558.)
- Nakanishi, Ueber den Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXX. 1901. No. 3. p. 106.)
- Shiga, K., Ueber den Erreger der Dysenterie in Japan. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXIII. 1898.)

- Shiga, K., Ueber den Dysenteriebacillus (*Bacillus dysenteriae*). (Ibid. Bd. XXIV. 1898.)
- —, Studien über die epidemische Dysenterie in Japan unter besonderer Berücksichtigung des *Bacillus dysenteriae*. (Dtsche med. Wochenschr. 1901. No. 43—45.)
- —, Bemerkungen zu Jägers „Die in Ostpreußen einheimische Ruhr, eine Amöbendysenterie“. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXXII. 1902. No. 5. p. 352.)
- —, Weitere Studien über den Dysenteriebacillus. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLI. 1902. Heft 2.)
- Strong, Journ. amer. med. assoc. Vol. XXXV. 1900. p. 498 and Report of the surg. general of the army. Washington 1900.
- Vedder, E. B. and Duval, C. W., The etiology of acute dysentery in the United States. (The Journ. of experim. med. Vol. VI. No. 2. 1902. February 5 und Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXXI. 1902. No. 4. p. 134.)

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Kenntnis der anaeroben Bakterien des Menschen.

[Aus dem pathologisch-anatomischen Institute in Wien
(Prof. Dr. A. Weichselbaum).]

II. Zur Aetiologie des Gasbrandes.

Von Dr. Anton Ghon und Dr. Milan Sachs.

(Erster Teil.)

Mit 3 Tafeln.

(Fortsetzung.)

Tierversuche.

Verwendet wurden zu den Versuchen Meerschweinchen, Kaninchen, weiße Mäuse und Tauben. Anfangs wurden für die Injektion Aufschwemmungen aus 24—48-stündigen Zuckeragarschüttelkulturen benutzt oder das Kondenswasser solcher Kulturen, falls es reichlicher abgeschieden war, später fast ausschließlich Zuckergelatinekulturen (siehe Mitteilung I), meist 48 Stunden alte, ausnahmsweise auch ältere. Vereinzelt gebrauchten wir auch Aufschwemmungen von Oberflächenkulturen auf Zuckeragarplatten. Die Aufschwemmungen waren immer in ausgekochtem Peptonwasser hergestellt.

Die gefallen Tiere wurden, wenn es anging, sogleich nach dem Tode sezirt, sonst, auch wenn sie während der Nacht fielen, bis zur Sektion auf Eis gehalten.

Die Sektion wurde immer unter streng sterilen Kautelen ausgeführt und von der Injektionsstelle sowie vom Herzblute, zuweilen auch von anderen Stellen des Körpers wurden neben Deckglaspräparaten anaerobe, meist auch aerobe Kulturen angefertigt. Blieben die Kulturen, z. B. aus dem Herzblute, steril, so wurde die Beobachtung derselben erst nach mehreren Tagen, gewöhnlich 5—6, abgeschlossen.

Die erhaltenen Kulturen wurden nicht bloß durch Deckglaspräparate, sondern häufig auch durch aeroben und anaeroben Plattenausstrich kontrolliert.

Es war genaues Arbeiten um so notwendiger, als es uns einige Male vorkam, daß bei subkutanen Infektionen, insonderheit bei Meerschweinchen, infolge von Gangrän an der Injektionsstelle eine sekundäre Infektion von außen erfolgte, meist mit einem Gram-negativen Bacillus

(Coli-Gruppe), oder daß bei längerem Liegen der Tiere wahrscheinlich vom Darne aus — in diesem Falle war der Infektionsmodus gleichgültig — ein anderes anaërobes Bakterium in den Organismus postmortal eindrang.

Bei der Besprechung der Ergebnisse unserer Tierversuche wollen wir eine Anzahl der uns wichtig erscheinenden Sektionsbefunde aus unseren Protokollen ausführlicher bringen. Es sei aber hier nachdrücklichst betont, daß dieser Erörterung unserer Tierversuche nur die Befunde absolut sicherer Reininfektionen zu Grunde liegen.

I. Meerschweinchen (= M).

a) Subkutane Einverleibung des Bacillus in kleinen Mengen bis zu 0,1 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur an Tieren von ca. 400 g Körpergewicht blieb völlig wirkungslos. Dabei war es gleichgültig, ob Kulturen verwendet wurden, die wiederholt Tiere derselben Art passiert hatten, oder aber Kulturen, die, vom Menschen herstammend, ohne vorherige Tierpassage mehrmals überimpft wurden.

Mengen von 0,5 ccm 48-stündiger Zuckergelatinekultur verursachten entweder schon den Tod des Tieres oder aber nur lokale Veränderungen, die wieder ausheilten. Letztere erhielten wir zuweilen auch durch größere als die eben angeführten Mengen. Diese rein lokalen Veränderungen bestanden darin, daß sich zunächst an der Injektionsstelle eine mehr oder minder große, meist teigige Anschwellung zeigte, in welcher oft deutliches feines Knistern nachweisbar war. Nach kürzerer oder längerer Zeit gingen diese Veränderungen entweder wieder vollständig zurück oder aber die Haut nekrotisierte im Bereiche der Anschwellung und es entwickelte sich dann ein Geschwür. Das entstandene Geschwür war verschieden groß, zeigte etwas unterminierte, unregelmäßige Ränder und einen speckig belegten Grund. In unmittelbarer Umgebung des Geschwürs fühlte sich die Haut verdickt an. Allmählich reinigte sich das Geschwür und verheilte.

Größere Mengen als die früher angegebenen verursachten fast ausnahmslos den Tod des Tieres. In unseren Versuchen, bei denen die Menge des einverleibten Virus eine schwankende war, verendeten die Tiere nach $8\frac{1}{2}$ —36 Stunden post infectionem. Oft schon wenige Stunden nach der Injektion wurden die Tiere weniger lebhaft und ließen in der meist teigigen, stärkeren oder geringeren Anschwellung an der Injektionsstelle mehr oder weniger deutlich Knistern nachweisen. Diese Veränderungen nahmen an Intensität ziemlich rasch zu und breiteten sich auch über die Grenzen der Injektionsstelle aus, und unter stetiger Zunahme derselben wurden die Tiere immer matter, äußerten meist auch Schmerzempfindung beim Berühren und blieben vor dem Tode gewöhnlich längere Zeit auf einer Seite liegen.

Bei der Sektion konnte man häufig im Bereiche der Injektionsstelle und meist auch in ihrer Umgebung durch die Haut deutliches Knistern tasten. Manchmal war die Bauchhaut an der Injektionsstelle durch Gasblasen und Flüssigkeit abgehoben oder in mehr oder minder großer Ausdehnung schmutzigrot gefärbt und dann durch einen mehr bläulich-roten Wall von der übrigen, normal aussehenden Bauchhaut abgegrenzt. In solchen Fällen war die Haut immer stark durchfeuchtet, so daß aus derselben beim Aufspannen der Tiere auf das Sezierbrett rötliche Flüssigkeit austrat.

Immer aber war bei den gefallenen Tieren das subkutane Binde- und Fettgewebe im Bereiche der Injektionsstelle sowie am Bauche und

Thorax, oft bis hinauf zum Halse von fleisch- oder kirschwasserähnlicher Flüssigkeit mehr oder weniger stark durchtränkt, besonders reichlich in den Inguinal- und Achselbeugen der Seite, auf welcher das Tier vor dem Tode durch kürzere oder längere Zeit gelegen war. Nicht selten war das subkutane Bindegewebe im unmittelbaren Bereiche der Injektionsstelle schmutzig graugelb, wie nekrotisch und von mehr oder weniger zahlreichen, meist kleineren Gasblasen durchsetzt. Solche fanden sich dann aber meist auch in dem angrenzenden ödematös durchtränkten subkutanen Gewebe der Bauch- und gewöhnlich auch der Brusthaut. In einzelnen Fällen sah man daneben noch kleinere oder größere dunkle Blutungen.

Aehnliche Veränderungen zeigten meist auch die oberflächlichen Muskelschichten der Bauchwand und des Thorax. Neben Aufquellung, verschieden starker Durchtränkung mit rötlicher Flüssigkeit fanden sich manchmal auch in den Muskelbündeln kleinere Blutungen und zwischen denselben Gasbläschen.

Die Lymphdrüsen der Inguinal- und Achselbeugen ließen gewöhnlich keine Veränderungen erkennen, in einzelnen Fällen jedoch zeigten sie Schwellung und stärkere Rötung.

Das Peritoneum parietale war meist glänzend und hellrot, in einigen Fällen aber dunkelrot, kirschfarben. In solchen Fällen zeigte auch die Muskulatur der Bauchwand ein ähnliches Aussehen, so daß es den Anschein hatte, als wären die Veränderungen des Peritoneums fortgeleitet.

Die übrigen Organe waren meist ohne charakteristische Veränderungen: die Milz blieb klein, war das eine Mal etwas dunkler, das andere Mal heller, die Nebennieren ließen keine stärkere Rötung erkennen, die Nieren zeigten meist nur geringfügige Zeichen von Degeneration, die Leber war meist dunkel braunrot, manchmal mehr gelbbraun, die Lungen gewöhnlich blutarm.

Bakterien ließen sich an der Injektionsstelle meist in reichlicher Menge und in den schon an anderer Stelle beschriebenen Formen nachweisen, sowohl mikroskopisch als auch durch die Kultur. Das Herzblut hingegen erwies sich in allen jenen Fällen als steril, welche unmittelbar oder kurz nach dem Tode zur Sektion kamen. In jenen Fällen, die erst einige Zeit nach dem Tode sezirt werden konnten, ließen sich Bacillen durch die Kultur auch im Herzblute nachweisen, und zwar im allgemeinen um so reichlicher, je später nach dem Tode die Sektion ausgeführt wurde. Es muß jedoch bemerkt werden, daß auch in solchen Fällen Bacillen nicht immer im Blute gefunden wurden, selbst dann nicht, wenn bis zur Sektion 8 und mehr Stunden verstrichen waren. In allen Fällen, in welchen das Peritoneum dunkelrot erschien, fanden sich in den davon angefertigten Abstreifpräparaten meist reichlich Bacillen und zwar gewöhnlich in längeren Fäden.

M 6, am 22. I. 1902 subkutan (Bauch) 5 ccm einer 36-stündigen Zuckergelatinekultur von den ersten Generationen des aus dem Menschen gezüchteten Stammes.

Schon nach 4 Stunden die Bauchhaut blasig abgehoben. Knistern deutlich. Allmähliche Ausbreitung der Gas- und Flüssigkeitsansammlung im subkutanen Bindegewebe gegen die Flanken und den Thorax.

Nach 10 Stunden wird das Tier durch Chloroform getötet.

Sektion, unmittelbar post mortem: Subkutanes Bindegewebe des Bauches und des Thorax serös-hämorrhagisch durchtränkt und von zahlreichen kleineren und größeren Gasblasen durchsetzt. In den inneren Organen keine Veränderungen.

Deckglaspräparate von der Injektionsstelle: Zahlreiche Gram-positive Stäbchen, häufig angeschwollen, spärlich lange Fäden.

Anaërobe Kulturen von der Injektionsstelle: Wachstum und Gasbildung (Reinkultur).

Anaërobe Kulturen vom Herzblut: steril.

M 9, am 29. I. 1902 3 ccm der Aufschwemmung einer Zuckeragar-Schüttelkultur, 48 Stunden alt, subkutan (linke Bauchseite).

Nach 48 Stunden Knistern an der Injektionsstelle.

Tod des Tieres nach ca. 18 Stunden.

Sektion, ca. 3 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis):

Knistern am Bauch und Thorax. Unterhautbinde- und Fettgewebe am Bauch und Thorax, in den Achselhöhlen und Inguinalbeugen von fleischwasserähnlicher Flüssigkeit und zahlreichen kleineren Gasblasen durchsetzt. Muskulatur des Bauches von verquollenem Aussehen und schmutzigrot. Desgleichen die Muskulatur des Thorax. Zwischen den Muskelbündel kleinere Gasblasen. Leber gelbbraun. Milz klein. Nebennieren weißlich-gelb. Lungen blutarm.

Deckglaspräparate von der subkutanen Flüssigkeit: Zahlreiche Gram-positive Bacillen und angeschwollene Formen. Endogene und freie Sporen.

Anaërobe Kulturen: a) subkutane Flüssigkeit: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Herzblut: 1 Kolonie derselben Bacillenart wie bei a).

Histologischer Befund: 1) Thoraxhaut mit oberflächlicher Muskelschicht: Hornschicht gelockert. Rete Malpighii gut erhalten, ebenso Haarbälge und -schäfte. Die Kerne des Papillarteiles der Cutis meist gut tingiert und nur zum geringen Teile undeutlich. Tiefere Schichten der Cutis kernärmer, ihre Bindegewebsbündel auseinandergedrängt, wie gequollen, zwischen denselben kleinere unregelmäßige Hohlräume, meist leer, zum Teil auch wie mit feinfaseriger Masse erfüllt. Solche Hohlräume reichlicher im subkutanen Binde- und Fettgewebe. Dasselbst auch größere Mengen feingranulierter Massen, die die fast kernlosen und gequollenen Bindegewebsbündel auseinanderrängen. Die Bündel und Fasern der oberflächlichen Muskelschicht gleichfalls auseinandergedrängt durch das gequollene und ödematöse interstitielle Bindegewebe. Kerne der Muskelfasern mehr oder minder gut erhalten. An Querschnitten die Fasern wie schollig, an Längsschnitten der Länge nach aufgefaserter oder in unregelmäßige, dunkler braun erscheinende Stücke zerfallen. Die Querstreifung vielfach ganz verloren gegangen oder undeutlich, an anderen Muskelfasern noch erhalten oder anscheinend deutlicher. Die größeren Gefäße der tieferen Hautschichten im allgemeinen gut erhalten, nur die Adventitia an einigen mit undeutlicher Kernfärbung. Blutkörperchen meist regelmäßig geformt, doch vielfach schwach tingiert, wie ausgelaugt. Nirgends entzündliche Veränderungen.

Bakterien in allen Schichten der Haut und des subkutanen Gewebes reichlich vorhanden, am reichlichsten im subkutanen Binde- und Fettgewebe und in den oberflächlichsten Muskelschichten, wo sie auch in den Fasern selbst liegen, am spärlichsten in den oberflächlichen Cutisanteilen, doch findet man Bakterien auch noch im Papillarteile der Cutis. Die Bakterien zeigen ein einheitliches Bild: Es sind Bacillen, durchweg Gram-positiv, teils in kurzen Formen, meist aber in kürzeren oder längeren Fäden, gerade oder gewunden. Unter den kurzen Formen solche mit Anschwellungen. Vereinzelt endogene Sporenbildung.

2) Bauchwand aus der rechten Inguinalbeuge: histologisch und bakteriologisch dieselben Veränderungen wie bei 1).

3) Leber: mäßig blutreich, Zellkonturen etwas undeutlich, Kerne gut erhalten. Spärlich Gram-positive Bacillen von demselben Aussehen wie bei 1) in größeren arteriellen Gefäßen der Glissonschen Kapsel.

M 13, am 26. IV. subkutan (linke Bauchseite) 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 11.

Tod des Tieres nach 8 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Sektion 9 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis):

Bauchhaut und Haut der linken Flanke livid gefärbt; beim Aufspannen des Tieres treten aus derselben kleinere Mengen serös-hämorrhagischer Flüssigkeit aus. Haut nirgends abgehoben. Unterhautbindegewebe an der Injektionsstelle, am Bauche, zum Teil auch am Thorax mehr oder minder reichlich von serös-hämorrhagischer Flüssigkeit durchtränkt. Kleinere, zum Teil auch konfluierende Blutungen im Unterhautbindegewebe der linken Flanke (Injektionsstelle). Dasselbst auch spärlich kleinere Gasblaschen. Muskulatur der Bauchwand feucht, in derselben vereinzelt kleinere Blutungen. Peritoneum parietale und viscerales glänzend, nicht gerötet. Leber dunkelbraun. Milz nicht vergrößert, lichtbraun. Nieren braunrot. Nebennieren gelblich-weiß. Lungen hyperämisch. Im Magen und Darm keine Veränderungen.

Deckglaspräparate von der Injektionsstelle: Vorwiegend Gram-positive Bacillen verschiedener Länge, kürzere Fäden. Die Formen gleichmäßig oder ange-

schwollen. Spärlicher Gram-negative und Uebergangsformen. Ziemlich viele Sporen. Keine Kapsel.

Keine Eigenbewegung.

In Jodpräparaten spärlich Braunfärbung, gleichmäßig oder fleckig.

Aërobe Kulturen von der Injektionsstelle: steril.

Anaërobe Kulturen von der Injektionsstelle und dem Herzblute: Wachstum und Gasbildung (Reinkultur).

Histologischer Befund: Haut und Unterhautbindegewebe mit 2 kleineren Lymphdrüsen von der linken Inguinalgegend: Hornschicht gelockert, stellenweise fehlend. Rete Malpighi, Haarbälge und -schäfte im allgemeinen gut erhalten. Im Papillarteil der Cutis noch gut gefärbte Kerne, ebenso in den tieferen Schichten der Cutis. Die Bindegewebsfasern sind sehr breit und gequollen. Im interstitiellen Bindegewebe der oberflächlichen Muskelschicht reichlich feingekörnte Massen (Oedem), die Muskelfasern dadurch auseinandergedrängt, oft verschmälert, aufgefasernt, teilweise auch schollig zerfallen, die Querstreifung teils noch erhalten, teils undeutlich. Einzelne Muskelfasern ganz homogen aussehend, die Kerne jedoch im allgemeinen gut erhalten und gut gefärbt. Zwei mitgetroffene kleinere Lymphdrüsen fast völlig von Blutungen durchsetzt. Kleinere Blutungsherde auch in der Kapsel der Drüsen und in ihrer Umgebung. Die Blutgefäße um die Lymphdrüsen stark gefüllt, in ihrer Nähe Blutungen und stellenweise auch stärkere Anhäufung meist multinukleärer Leukocyten. Wo Blutungsherde und entzündliche Infiltration fehlen, sind die Bindegewebsfasern durch eine homogene oder feingekörnte Masse auseinandergedrängt. Multinukleäre Leukocyten durchsetzen auch teilweise die Gefäßwandungen und zeigen vielfach ausgesprochenen Kernzerfall.

Bakterien finden sich spärlich in den tieferen Schichten der Cutis, reichlicher im subkutanen Bindegewebe und in der oberflächlichen Muskelschicht, vorwiegend dort, wo zellige und hämorrhagische Infiltration fehlen. In den Lymphdrüsen und in dem sie umgebenden, von multinukleären Leukocyten und Blutungen durchsetzten Bindegewebe fehlen Bakterien. Die Bakterien sind durchaus Gram-positive Bacillen von demselben Aussehen wie bei M 9.

M 15, 300 g, am 1. V. 1902 subkutan (linke Bauchseite) 0,7 ccm des stark getrüben Kondenswassers einer 48-stündigen Zuckeragar-Schüttelkultur von M 14.

Tod des Tieres nach 18 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Sektion $\frac{3}{4}$ Stunden post mortem: Haut durch kleinere und größere Gasblasen im Bereiche der Injektionsstelle und deren Umgebung abgehoben. Die Gasblasen durch die Haut sichtbar. Knistern über Bauch und Thorax. Haut rötlich und stark durchfeuchtet („schwitz“). Im Bereiche der Injektionsstelle eine ca. talergroße Partie der Haut durch einen unregelmäßig begrenzten, bläulich-roten Wall abgegrenzt, namentlich gegen beide Inguinalgegenden hin. Dasselbe das subkutane Bindegewebe und die oberflächlichen Muskelschichten der Bauchwand weißlich-gelb und von kleineren Gasblasen durchsetzt. In der Umgebung sowie am ganzen Bauche und Thorax bis hinauf zum Halse das zum Teile abgehobene subkutane Bindegewebe wie auch die Muskulatur gleichmäßig rötlich und von serös-hämorrhagischer Flüssigkeit reichlich durchtränkt. Besonders reichlich ist diese Flüssigkeit in der linken Achselhöhle und linken Inguinalbeuge angesammelt.

Inguinale Lymphdrüsen nicht vergrößert. Peritoneum parietale nicht gerötet, glänzend. Milz klein, braunrot. Leber gelbbraun. Nieren rötlich-braun. Nebennieren weißlich-gelb. Lungen hyperämisch. Herz prall gefüllt.

Deckglaspräparate von der linken Inguinalbeuge: überwiegend Gram-positive Bacillen verschiedener Länge. Reichlich Fäden, spärlich angeschwollene Formen und Sporen. Vereinzelt Gram-negative Formen. Blauvioletter Hof um die Bacillen in nach Welch gefärbten Präparaten.

Keine Eigenbewegung.

In Jodpräparaten Braunschwarzfärbung, meist fleckig.

Deckglaspräparate vom Peritoneum parietale: In gleicher Menge dieselben Bakterienformen wie in der Inguinalbeuge, nur längere Fadenbildung.

Aërobe Kulturen von der subkutanen Flüssigkeit: steril.

Anaërobe Kulturen von der subkutanen Flüssigkeit, dem Herzblute und dem Peritoneum parietale: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

M 17, 306 g, am 10. Mai 1902 subkutan (linke Bauchseite) 1 ccm Zuckergelatinekultur, 48 Stunden, von M 16.

Nach ca. 24 Stunden erscheint das Tier schwer krank und zeigt über Bauch und Thorax eine teigige, ziemlich mächtige Anschwellung ohne Knistern.

Tod des Tieres nach 35 Stunden.

Sektion 8 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis):

Bauchhaut im Bereiche der Injektionsstelle und ihrem Umkreise rötlich und

feucht. Deutliches Knistern fühlbar. Haut nirgends abgehoben, Unterhautbindegewebe und oberflächliche Muskelschichten der Bauchwand und des Thorax fleischwasserfarben und stark durchfeuchtet, im Bereiche der Injektionsstelle mißfarben graugelb, wie nekrotisch. In der rechten Inguinalbeuge sowie am Halse das Unterhautbindegewebe mächtig ödematös und von kirschfarbener Flüssigkeit durchtränkt. An der Injektionsstelle, am Thorax und in den Gelenkbeugen Gasblasen im Unterhautbindegewebe. Peritoneum parietale gleichmäßig fleischwasserfarben. Milz dunkel, kaum vergrößert. Leber braunrot, von Coccidien durchsetzt. Nieren braunrot. Nebennieren gelblich-weiß. Lungen blutleer. Magen und Darm ohne Veränderungen.

Deckglaspräparate: a) Injektionsstelle: Reichlich Gram-positive Bacillen verschiedener Länge, meist gleichmäßig im Aussehen, seltener angeschwollene Formen und vereinzelt solche mit polständigen Sporen. Reichlich längere Fäden. Vereinzelt Gram-negative Formen derselben Art.

In nach Welch gefärbten Präparaten ein deutlich begrenzter lichter Hof um die Bacillen.

In Jodpräparaten gleichmäßige lichtgelbe Färbung der Bacillen.

Mäßig schnelle Eigenbewegung.

b) Peritoneum parietale: Mäßig reichlich Gram-positive Bacillen von derselben Beschaffenheit wie bei a).

Kulturen: a) Injektionsstelle: Aërobe Kulturen steril, anaërobe: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Herzblut: Anaërobe Kulturen steril.

Histologische Untersuchung:

1) Haut vom Halse: Hornschicht, Haarbälge und -schäfte ohne Veränderungen. Kerne im Papillarteile der Cutis gut gefärbt. Bindegewebsfasern gequollen und auseinandergedrängt. Die tieferen Cutisschichten, mehr noch das subkutane Binde- und Fettgewebe sowie das interstitielle Bindegewebe der oberflächlichen Muskelschicht kernarm, streckenweise kernlos und auseinandergedrängt durch eine feingekörnte oder völlig homogen aussehende Masse. Die Muskelfasern meist ohne deutliche Querstreifung, homogen oder schollig zerfallen, auseinandergedrängt.

Bakterien mäßig reichlich, am reichlichsten im interstitiellen Bindegewebe der Muskelschicht. Papillarteil der Cutis frei von Bakterien. Es sind Bacillen einer Art, Gram-positiv, mit gegliederter und ungegliederter Fadenbildung, häufig wie von Vakuolen durchsetzt.

2) Bauchwand von der Injektionsstelle: Subkutanes Binde- und Fettgewebe und oberflächliche Muskelschichten sehr reichlich von multinukleären Leukocyten durchsetzt, zwischen welchen streckenweise feingekörnte oder feinfaserig aussehende Massen und Blutungsherde sichtbar sind, sowie kleinere und größere rundliche, meist leere Hohlräume. Bindegewebs- und Muskelfasern sind dadurch breit auseinandergedrängt. Gegen die tieferen Muskelschichten setzt sich diese Infiltration ziemlich scharf ab und die multinukleären Leukocyten erscheinen daselbst wie zu einem Walle verdichtet und zeigen vielfach Kernzerfall. Darüber hinaus findet man polynukleäre Leukocyten und rote Blutscheiben spärlicher im interstitiellen Bindegewebe der Muskel. Die Muskelfasern selbst zeigen innerhalb und außerhalb der Infiltrationszone schwere degenerative Veränderungen: Auffaserung, Quellung und Zerfall sowie teilweisen Verlust der Querstreifung. Viele der Fasern erscheinen ganz homogen und viele zeigen zwischen den Zerfallsstücken multinukleäre Leukocyten. Die Muskelkerne meist noch gut gefärbt, nur im Bereiche der entzündlich veränderten Partien findet man sie weniger zahlreich und undeutlicher tingiert. Das interstitielle Bindegewebe der nicht infiltrierten Zone stark gequollen, die Kerne jedoch gut gefärbt. Deegleichen die der Gefäßendothelien. Um die Gefäße sieht man auch in den sonst nicht entzündlich veränderten Stellen meist kleinere Anhäufungen länglicher einkerniger Zellen und multinukleärer Leukocyten.

Bakterien in enorm reichlicher Menge nachweisbar, vor allem im Bereiche der entzündlich veränderten Partien und hier wieder vorwiegend um den Leukocytenwall. In den nicht entzündlich veränderten Partien sieht man sie nur spärlich oder gar nicht. Es sind Bacillen von einheitlicher Dicke, aber verschiedener Länge, nicht selten angeschwollen und mit Fadenbildung, Gram-positiv, mit Vakuolen oder körniger Färbung. In den Präparaten nach Gram-Weigert Sporen nicht sicher nachweisbar.

M 27, 260 g, subkutan (linke Bauchseite) eine Aufschwemmung von 3 Agarplatten mit diffusum Ueberzuge (Wasserstoffatmosphäre) in 1,8 cm ausgekochtem Peptonwasser.

Nach 9 Stunden erscheint das Tier schwerkrank und zeigt im Umkreise der Injektionsstelle bis zum Rippenbogen einerseits und der Symphyse andererseits eine mächtige teigige Anschwellung.

Nach ca. 15 Stunden tot aufgefunden.

Sektion, 8 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis): Haut stark feucht. Knistern am Bauche und Thorax. Unterhautbinde- und Fettgewebe des Bauches und Thorax, der Achselhöhlen und Inguinalbeugen reichlich durchtränkt von einer kirschrot aussehenden Flüssigkeit, am stärksten in der rechten Inguinalbeuge und Achselhöhle. Muskulatur am Bauche und Thorax feucht, diffus kirschrot, im unteren Teile des Abdomens lichter rot. Peritoneum glänzend, feucht. Leber braungelb. Milz klein, braunrot. Nieren lichtbraungelb. Nebennieren weißlich-gelb. Lungen blutleer.

Deckglaspräparate: a) subkutane Flüssigkeit: Zahlreiche, fast ausschließlich Gram-positive Bacillen verschiedener Länge. Große geblähte Formen. Vereinzelt Uebergangs- und Gram-negative Formen.

In Jodpräparaten fleckige Braunfärbung der angeschwollenen Formen.

Kulturen: a) subkutane Flüssigkeit: Aërob steril. Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Herzblut: Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Die intraperitoneale Infektion bereitete häufig Schwierigkeiten, weil selbst bei vorsichtigem Arbeiten geringe Mengen des Infektionsstoffes im Stichkanale der Bauchwand zurückblieben bzw. in diesen hineingepreßt wurden. In allen solchen Fällen gesellte sich zur intraperitonealen auch noch eine subkutane Infektion, die gewöhnlich in den Vordergrund trat, so daß das Sektionsbild der gefallen Tiere meist völlig dem bei rein subkutaner Einverleibung des Virus glich. Hervorgehoben zu werden verdient dabei die Tatsache, daß wir bei diesen Fällen reichlichste Durchtränkung des subkutanen Binde- und Fettgewebes mit kirschfarbener Flüssigkeit ohne Gasbläschen sicher beobachten konnten. Es war dabei auffallend, daß schon relativ geringe Mengen subkutan ausgetretenen Infektionsstoffes genügten, rasch und sicher die ausgebreiteten subkutanen Veränderungen hervorzurufen, Mengen, die bei reiner subkutaner Einverleibung unserer Erfahrung nach kaum diesen Effekt hätten erzeugen können. Der Versuch, in einigen Fällen sofort nach der Einverleibung des Virus die Haut um den Stichkanal zu spalten und durch Bildung einer Hauttasche in der Umgebung dieselbe offen zu halten, blieb ohne jeden Einfluß: auch in solchen Fällen schloß sich der intraperitonealen noch eine subkutane Infektion an.

Immer waren in diesen Fällen neben den subkutanen Veränderungen auch noch mehr oder weniger ausgeprägte peritoneale vorhanden, indem das Peritoneum parietale und viscerales sehr feucht und dunkler rot erschien, die Darmschlingen durch zarte fibrinöse Fäden verklebt waren und sich feine, leicht abziehbare, fibrinöse Häutchen auf der Oberfläche der Leber und Milz vorfanden.

Diese entzündlichen Veränderungen des Peritoneums traten in jenen wenigen Fällen noch deutlicher zu Tage, bei welchen die intraperitoneale Infektion anscheinend glatt ausgeführt werden konnte. Es fanden sich bei der Sektion der gefallen Tiere allerdings auch in diesen Fällen subkutane Veränderungen vor, doch waren diese so geringfügig gegenüber den in den anderen Fällen beobachteten und gegenüber den gleichzeitig vorhandenen peritonealen Veränderungen, daß sie für den Tod des Versuchstieres nicht in Anschlag gebracht werden dürfen. Dafür zeigte sich das Abdomen aufgetrieben und in der Bauchhöhle fand sich freie, trübe, rötliche Flüssigkeit, das Peritoneum war dunkel kirschfarben, ebenso das Netz und in diesem, sowie auf der Leber und Milz, fand man zarte, fibrinöse Auflagerungen. Und daß diese Veränderungen wirklich entzündlicher Natur und einzig bedingt waren durch den einverleibten Bacillus, bewiesen die histologische und bakteriologische Untersuchung.

Auch in allen diesen Fällen blieb die Milz klein, doch traten die degenerativen Veränderungen der parenchymatösen Bauchorgane, namentlich die der Leber, stärker hervor als bei rein subkutaner Infektion.

Schaumorgane fanden sich dabei nie vor; allerdings hatte auch die bakteriologische Untersuchung des Herzblutes in allen diesen Fällen ausnahmslos ein negatives Ergebnis.

M 20, 178 g, am 22. Mai 1902 intraperitoneal 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur.

Beim Herausziehen der Nadel gelangt eine kleine Menge der Flüssigkeit in das subkutane Gewebe um den Stichkanal.

Tod des Tieres nach 16 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Sektion, 7 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis). Bauchhaut durchfeuchtet (schwitzt). Unterhautbindegewebe und oberflächliche Muskelschichten des ganzen Bauches, beider Flanken und des Thorax, ebenso das Binde- und Fettgewebe der Achselhöhlen und Inguinalbeugen ziemlich gleichmäßig durchtränkt von einer fleischwasserähnlichen, stellenweise dunkler rot gefärbten Flüssigkeit. Am reichlichsten ist diese Flüssigkeit in der rechten Inguinalbeuge angesammelt und zeigt daselbst eine fast schwärzlichrote Farbe. Nirgends Gasbläschen, nirgends die Haut abgehoben. Peritoneum parietale feucht, rötlich; ebenso das Peritoneum viscerales. Darm-schlingen untereinander leicht verklebt. Milz braunrot, klein. Leber groß, wie gekocht. Nieren braungelb. Nebennieren gelblich-weiß. Lungen blutarm.

Deckglaspräparate: a) Flüssigkeit aus der rechten Inguinalbeuge: Ziemlich reichlich Gram-positive Bacillen, meist kurz. Spärlich Gram-negative Formen und angeschwollene Formen, teils dunkelviolett, teils undeutlich gefärbt. Keine Sporen.

b) Peritoneum: Mäßig viele zellige Elemente, darunter polynukleäre Leukocyten. Wenig Gram-positive Bacillen und angeschwollene Formen, spärlich dickere und dünnere Gram-negative Formen.

Kulturen: a) Subkutane Flüssigkeit: Anaërob Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Peritoneum: Aërob: Steril. Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

c) Herzblut: Anaërob: Steril.

Histologischer Befund: 1) Bauchwand: Keine entzündlichen Veränderungen. Die Muskelbündel und -fasern auseinandergedrängt durch lockeres, gequollenes und mit feingekörnter Masse erfülltes Bindegewebe. Muskelfasern selbst in der bereits wiederholt beschriebenen Weise schwer verändert, die Kerne jedoch gut gefärbt, während die Kerne des interstitiellen Bindegewebes vielfach fehlen oder undeutlich erscheinen.

Bakterien in enormen Mengen: Gram-positive Bacillen einer Art, gleichmäßig tingiert, von verschiedener Länge, mit oft längerer Fadenbildung. Keine sicheren Sporen.

2) Darm: Serosa in den untersuchten Schnitten ohne besondere Veränderungen. An einzelnen Stellen sieht man auf derselben mäßig viele Gram-positive Bacillen von demselben Aussehen wie bei 1).

M 23, 375 g, am 30. Mai 1902 intraperitoneal 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 20.

Beim Herausziehen der Nadel gelangte etwas der Injektionsflüssigkeit durch die Bauchpresse unter die Bauchhaut um den Stichkanal; es entstand dadurch eine ca. linsengroße Vorwölbung der Haut, die sofort mit glühendem Spatel breit gespalten und worauf noch überdies in der Umgebung des Stichkanals eine Hauttasche angelegt wurde. Das Tier macht noch am selben Abend einen schwerkranken Eindruck und aus der offen gelassenen Hautwunde tritt blutig-seröse, mit spärlichen Gasblasen untermengte Flüssigkeit hervor.

Tod nach 23 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Sektion, unmittelbar post mortem: Am Bauch und Thorax deutliches Knistern. Aus der Hautwunde quillt serös-hämorrhagische Flüssigkeit, untermengt mit Gasblasen. Subkutanes Fett- und Bindegewebe am Bauche und Thorax bis zum Halse, in beiden Flanken und in den Achselhöhlen reichlich durchtränkt von dunkel-kirschroter Flüssigkeit, untermengt mit kleineren, bis etwa stecknadelkopf großen Gasbläschen. In der Bauchhöhle geringe Mengen leicht gerührter, rötlich gefärbter Flüssigkeit. Peritoneum feucht, rötlich und von fädigen und flockigen Gerinnseln bedeckt. Milz klein, braunrot, ihre Oberfläche mit einem zarten, abziehbaren, fibrinösen Häutchen bedeckt. Leber gelb-

braun, auf ihrer Oberfläche ein zartes Fibrinhäutchen. Nieren braungelb. Nebennieren rötlich-gelb, besonders die rechte. Lungen blutreicher.

Deckglaspräparate: a) peritoneale Flüssigkeit: Wenig Zellen, sehr spärlich Gram-positive Bacillen, vereinzelt angeschwollene Formen. Keine anderen Bakterien.

b) Fibrinbelag der Leber: wie bei a).

Kulturen: a) peritoneale Flüssigkeit: Aërob: Steril. Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Herzblut: Anaërob: Steril.

Histologischer Befund:

1) Peritonealwand vom rechten Hypochondrium: Muskulatur und interstitielles Bindegewebe zeigen im allgemeinen dieselben Veränderungen, wie sie bei M 20 beschrieben wurden. Nirgend Entzündung. Bakterien reichlich und von dem Aussehen und den färberischen Eigenschaften wie bei M 20.

Peritoneum streckenweise kernlos, die Bindegewebsfasern desselben stark gequollen, in ihren Konturen kaum zu erkennen, in den mit Hämalaun-Eosin gefärbten Präparaten schmutzig blaurot und teilweise durch heller tingierte, homogene oder feingekörnte Massen auseinandergedrängt. Endothelien der Blutgefäße auch in den schwer veränderten Partien gut gefärbt.

Reichlich Gram-positive Bacillen von dem Aussehen wie in der Bauchwand.

(Fortsetzung folgt.)

Nachdruck verboten.

Weitere Bemerkungen zur Entstehung von Rattenepizootieen.

[Aus dem hygienisch-bakteriologischen Laboratorium der k. k. landwirtschaftlich-bakteriologischen und Pflanzenschutzstation in Wien.]

Von Dr. E. Wiener.

In einigen früheren Mitteilungen¹⁾ habe ich versucht, die Bedeutung der Danysz-Bacillen und einiger anderer Colistämme für die Bekämpfung der Rattenplage darzustellen.

Es zeigte sich, daß die Virulenz aller Arten bisher bekannter rattenpathogener Bacillen weniger konstant ist, als dies bei den meisten anderen pathogenen Bakterien beobachtet wurde. Ob dieselben von spontan aufgetauchten Rattenepizootieen stammen oder im Laboratorium durch Anpassung aus harmlosen Coli-Stämmen rattenpathogen gemacht wurden, immer kann man konstatieren, daß sich nach verhältnismäßig kurzer Zeit die Virulenz fast vollkommen verliert oder dieselbe zum mindesten sehr herabgesetzt wird.

Am längsten erhielt sie sich nach dem bisher Bekannten bei der ersten von Danysz übersandten Kultur, viel kürzere Zeit bei der von Sawtschenko übermittelten; eine mittlere Stelle nahmen die im Vorjahre aus Coli-Bacillen gewonnenen ein, nachdem diese letzteren durch Anpassung rattenpathogen geworden waren.

Im Herbst v. J. stellte mir Herr Prof. v. Escherich neuerlich auf mein Ersuchen in liebenswürdigster Weise durch Herrn Dr. Moro eine aus dem Säuglingsdarme stammende Coli-Kultur zur Verfügung, welche alle authentischen Merkmale hatte, sowie die bei meinen früheren Versuchen verwendeten Kulturen derselben Provenienz.

1) Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 10. — Dieses Centralbl. Bd. XXXII. 1902. No. 1. — Zeitschr. f. d. landwirtschaftl. Versuchswesen in Oesterreich. 1902.

Mit diesen neuen Kulturen wurden vorher mit Ammoniak und mit NaOH-Lösungen beschickte Eier, wie bereits mehrfach angegeben, infiziert, eine weitere Gruppe anstatt mit Ammoniak bzw. NaOH-Lösung mit $\frac{1}{2}$ ccm einer 2-proz. Lösung von phosphorsaurem Ammoniak, welche Lösung in üblicher Weise mit sterilisiertem, ausgezogenem Röhrchen in das Ei geblasen wurde.

Ueber die Versuche mit Kulturen aus den Ammoniak- bzw. NaOH-Eiern soll nur kurz berichtet werden, daß dieselben den bereits beschriebenen ähnlich verliefen.

Auch die Infektionsversuche mit Kulturen aus den mit 2-proz. phosphorsaurem Ammoniak beschickten Eiern zeigten beträchtliche Virulenzsteigerung.

Zunächst wurden aus der übermittelten Coli-Kultur einige Ratten derart gefüttert, daß dieselben täglich durch mehrere Tage je eine 24-stündige Agarstrichkultur erhielten, welche in Bouillon aufgenommen und tunlichst gleichmäßig verteilt auf Weizenbrot gegossen wurde. Die Tiere, welche vorher durch 24 Stunden gehungert hatten, fraßen in einigen Stunden dieses Brot, erhielten vom 5.—6. Tage ab ihre gewöhnliche Nahrung, gekochten Mais, und zeigten während der ganzen Beobachtungsdauer von 90—92 Tagen keine Krankheitserscheinungen.

In einer der Versuchsreihen erhielt eine Ratte (P. No. 133) dieselbe Kulturmenge wie die Kontrolltiere, jedoch aus einem Ei gezüchtet, welches, mit $\frac{1}{2}$ ccm 2-proz. phosphorsaurer Ammoniaklösung beschickt, durch 5 Tage im Thermostaten gestanden hatte. Das Ei war nach dieser Zeit dünnflüssig, zeigte im übrigen keine Abweichung von den anderen Eikulturen.

Das Tier wurde am nächsten Tage krank, fraß aber auch die zweite Portion, erhielt kein weiteres Infektionsmaterial mehr und verendete nach 9 Tagen. Massenhaft Bacillen in allen Organen. Ausstriche mit denselben auf schrägem Agar zeigten überall Wachstum. Bezüglich des Obduktionsbefundes kann ich mich auf das früher Mitgeteilte beziehen. Aus den Kulturen, welche aus der Milz gezüchtet waren, wurde eine zweite Ratte (P. No. 149) in derselben Weise durch 3 Tage gefüttert und erhielt dann wieder die gewöhnliche Nahrung. Sie verendete nach 27 Tagen. Aus allen Organen wurden die Bacillen in Reinkultur gezüchtet. Mit einer 24-stündigen Agarkultur aus der Milz dieses Tieres wurde eine frische Ratte (P. No. 156) gefüttert, erhielt an den 2 nächstfolgenden Tagen als ausschließliche Nahrung Weizenbrot, welches jedesmal in 10 ccm 24-stündiger Bouillonkultur getränkt wurde, von da ab wieder die gewöhnliche Maisnahrung. Tod dieser Ratte nach 7 Tagen. Bacillarbefund in allen Organen positiv. Eine andere Ratte (P. N. 160) erhielt dasselbe Infektionsmaterial wie das Tier P. No. 156 durch 3 Tage, erholte sich nach 10 Tagen, soweit dies überhaupt konstatiert werden konnte, wenigstens fraß sie wieder den größten Teil der gewöhnlichen Nahrung. Als sie am 10. Tage nach der ersten Infektion neuerlich Brot in 10 ccm 6 Tage alter Bouillonkultur getränkt erhielt, erkrankte sie schon am nächsten Tage und verendete nach weiteren 6 Tagen, also 17 Tage nach der ersten Infektion. Die Sektion ergab beträchtliche Abmagerung, entsprach im übrigen dem typischen Bild. Bacillarbefund in mäßiger Menge in allen Organen.

Dieses letzte Tier wäre möglicherweise erst einer langsamen Kachexie erlegen, wie sie in den schleppend verlaufenden Fällen eintritt, wenn nicht die zweite Infektion am 10. Tage nach Versuchsbeginn

durch die geringe Menge 10 Tage alter Bouillonkultur erfolgt wäre, welche gewiß nicht einmal vollständig von dem Tiere aufgenommen wurde, da es noch altes Futter, gekochten Mais, vom Tage vorher in seinem Käfig hatte. Der verhältnismäßig rasche Krankheitsverlauf muß daher auf eine Additionalinfektion zurückgeführt werden.

Derartige Additionalinfektionen haben auch praktische Wichtigkeit, da es hierdurch in den Bereich der Möglichkeit gerückt wird, daß Tiere, insbesondere die sehr gefräßigen Ratten, welche eine einmalige Infektion fast überstanden haben, nun doch an einer neuerlich erworbenen zu Grunde gehen.

Soweit sich die mit den in der beschriebenen Weise gezüchteten Kulturen unternommenen praktischen Versuche überblicken lassen, sind dieselben aufmunternd. Die Station hat im Jahre 1902 981 Agarkulturen an Interessenten abgegeben, welche mit den Erfolgen in den meisten Fällen zufrieden waren.

Die Resultate in praxi hängen hauptsächlich von den örtlichen Verhältnissen und von der richtigen Handhabung mit dem Infektionsmaterial ab. Es kommt manchmal vor, daß Interessenten selbst trotz der mitgegebenen genauen Anweisung die Kulturmasse gar nicht auf das Brot bringen; in solchen Fällen darf man sich über ein negatives Ergebnis gar nicht wundern.

Ebensowenig kann man verlangen, daß das Aufstreuen von Infektionsmaterial in einem kleinen Laden, z. B. einem Fleischerladen, in der Mitte anderer Viktualienläden dauernden Erfolg haben kann. Die Leute beanspruchen dies auch gar nicht, sondern sind mit dem Erfolge zufrieden, wenn es ihnen, wie dies in mehreren konkreten Fällen konstatiert wurde, gelingt, die Ratten für einige Zeit, für 6 Wochen bis 3 Monate, los zu werden. Ein Fleischer, welcher seinen Laden neben einer Zuckerbäckerei hat, bezieht von Zeit zu Zeit immer wieder einige Kulturröhrchen und gibt selbst an, er glaube, daß das Mittel nicht dauernd nützen könne, weil eben nach einem gewissen Zeitraum die Ratten aus dem benachbarten Zuckerbäckerladen wieder einwandern.

Wie schon mehrfach betont, hat diese Art der Rattenvertilgung um so größere Aussicht auf Erfolg, in je größeren Bezirken sie gleichzeitig zur Anwendung kommt, und hat daher die Ansicht Tidswells¹⁾ keine Berechtigung, welcher bezüglich des Bac. Danysz sagt, derselbe sei für die Rattenvertilgung bedeutungslos, weil sich bloß eine Auswanderung, nicht aber eine vollständige Vertilgung der Ratten erzielen lasse. Die Auswanderung der Ratten ist eben der beste Beweis dafür, daß dieselben das ausgestreute infizierte Futter als Schädlichkeit empfinden. Derartige Fälle sind in Brehms Tierleben zitiert; es ereignete sich, daß Feldmäuse nach Ausbruch einer Epizootie den Landstrich in großen Scharen verließen. Das, was Tidswell verlangt, wird sich — und man kann sagen glücklicherweise — nie ereignen, denn ein Bacillus, welcher die Gewähr einer unbedingten Vertilgung für alle Ratten besäße, könnte auch für den Menschen möglicherweise eine sehr unangenehme Bedeutung erlangen.

Auch Oettinger²⁾ ist mit den bisherigen Erfolgen der Rattenvertilgung durch Infektion nicht zufrieden. Er verlangt, man solle, bevor

1) Journal of the sanitary institute of London. Vol. XXI. 1901. p. 575.

2) Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 8.

man etwas mit den derzeitigen Methoden anfängt, lieber warten, bis es gelingt, mit Hilfe einer praktisch brauchbaren Methode die Wirkung der Danysz-Bacillen zu erhöhen.

Dieser Autor meint, daß dies bisher nicht gelungen ist und hat einige Versuche nachgeprüft. Es standen ihm 2 Original-Danysz-Kulturen und eine, deren Virulenz durch Eipassage erhöht war, zur Verfügung. Oettinger leistet sich auf Grund seiner negativen bakteriellen Ergebnisse, wobei zu bemerken ist, daß er, abgesehen von Krausz¹⁾, der einzige ist, welcher solche verzeichnet, den Ausspruch, daß seine mit Danysz-Kulturen verschiedener Provenienz gefütterten und erlegenen Ratten an zufälligen Momenten zu Grunde gegangen sind, nicht aber an der Infektion. Wenn man einer großen Anzahl anderer Autoren mit positivem Ergebnis gegenübersteht, sollte man mit solchen kategorischen Aussprüchen und den aus denselben gezogenen Konklusionen denn doch etwas vorsichtiger sein. Aus dem Umstande, daß es Oettinger nicht gelungen ist, meine Experimente nachzumachen, ist er noch nicht berechtigt, über dieselben ein absprechendes Urteil zu fällen. Denn ein einwandfrei erzielttes positives Ergebnis wiegt in der bakteriellen Forschung viele negative auf, nicht aber umgekehrt, besonders wenn das Ergebnis so klar ist wie bei einer Fütterung mit verhältnismäßig geringen Mengen Infektionsmaterial per os und darauf folgender Allgemeininfektion.

In einem Falle hat überdies Oettinger selbst zweifellose Virulenzsteigerung im Ei konstatieren müssen. Es betraf dies ein durch 75 Tage im Brütkasten gestandenes Ei, welches, mit Brot zu einem Brei vermengt, an 2 Ratten verfüttert wurde, welche es am selben Tage fraßen und nach 3 bzw. 7 Tagen starben. Aus den Organen der nach 3 Tagen verendeten Ratte ließ sich (aus Herzblut, Milz und Leber) der verfütterte Bacillus in Reinkultur züchten, welche noch für 2 andere Tiere ziemlich virulent war, da dieselben am 9. bzw. 11. Tage nach der Infektion starben; Bacillarbefund bei diesen letzteren ist nicht angegeben. Am auffälligsten an den Darstellungen Oettingers ist der — mit einer einzigen Ausnahme — stets negative Bacillarbefund, und zwar selbst bei solchen Ratten, welche wenige Tage nach der Infektion zu Grunde gingen. Schon aus diesem Grunde bin ich mit Oettinger bezüglich einer Stelle seiner Abhandlung einer Meinung, daß „die oben angeführten gestorbenen Ratten an zufälligen Momenten zu Grunde gegangen, nicht aber der Infektion erlegen sind“.

Nachdem die im Vorjahre unternommenen Versuche mit Coli-Kulturen bei der oben dargestellten Wiederholung durchaus eindeutig, und die früheren Versuche bestätigend ausfielen, versuchte ich vom Menschen stammende Typhusbacillen, welche mir Herr Dr. Binot vom Institut Pasteur in Paris in liebenswürdigster Weise zur Verfügung gestellt hatte, an den Rattenkörper anzupassen, um die Möglichkeit einer durch Typhusbacillen hervorgerufenen Rattenepizootie zu prüfen.

Die Typhusbacillen erwiesen sich kulturell und biologisch als dem üblichen Schema entsprechend. Sie zeigten mit Typhusimmenserum im Verhältnisse von 1 : 15 000 Agglomeration, und wurden wenige Monate alte Kaninchen und Meerschweinchen, intraperitoneal mit einer mittelgroßen Oese der 24-stündigen Agarkultur infiziert, binnen 24 Stunden

1) Deutsche med. Wochenschr. 1901. p. 351.

getötet. Bei den Versuchen ging ich von einer Kultur aus, welche vor $\frac{3}{4}$ Jahren aus einem jungen Kaninchen gezüchtet war.

Einige Ratten erhielten durch 7 Tage je 10 ccm 24-stündiger Bouillonkultur, auf Brot gegossen, verfüttert. Keine Krankheitserscheinungen durch 102 Tage.

3 Ratten erhielten ebenfalls durch mehrere Tage 24-stündige Bouillonkulturen derselben Provenienz, welche vorher durch 8 bzw. 20 Tage in Eiern nach der des öfteren angegebenen Methode gezüchtet waren, in welche nämlich vorher $\frac{1}{2}$ ccm 2-proz. Lösung von phosphorsaurem Ammoniak gegeben wurde.

Alle Tiere, auch die Kontrolltiere, hungerten 24 Stunden vor Beginn der Versuche, da die ausgehungerten Tiere das in infizierter Bouillon getränkte Brot alsbald auffressen, dann auch die Aufnahme des Infektionsmaterials im Wege des Darmkanales bei hungernden Tieren rascher erfolgt, dasselbe vor der Injektion weniger durch Austrocknung und Verunreinigungen leidet, während satte Tiere das Futter manchmal tagelang unberührt lassen — insbesondere wenn anderes als das bisherige gegeben wird —, wodurch diese beiden Möglichkeiten der Austrocknung und Verunreinigung des Infektionsmaterials eher eintreten.

Eine Ratte erhielt auf diese Weise an 3 aufeinander folgenden Tagen je 10 ccm 24-stündiger Typhus-Bouillonkultur, vom 4. Tage an die gewöhnliche Maisnahrung. Am 7. Tage zeigte dieses Tier Unlust zum Fressen, es schien krank, das Fell war etwas gesträubt. Dieser Zustand dauerte durch 3 Tage an; vom 10. Tage an erholte es sich jedoch, wurde ganz munter, fraß die gewöhnliche Futterportion vollständig auf und blieb auch während der ganzen Beobachtungsdauer von 90 Tagen anscheinend gesund.

Zwei andere Ratten wurden unter den gleichen Umständen an 3 aufeinander folgenden Tagen mit Kulturen derselben Provenienz gefüttert, erkrankten ebenfalls nach 7 bzw. 10 Tagen, erholten sich alsbald vollständig und erhielten am 20. und 21. Tage nach der ersten Infektion neuerdings 6 bzw. 8 Tage alte Bouillonkulturen derselben Provenienz. Diese beiden Tiere verendeten am 31. bzw. 38. Tage nach der ersten Infektion.

Die Sektion ergab bei beiden Tieren beträchtliche Abmagerung. Der Dünndarm war mit hellbraunen, stellenweise etwas rötlich tingierten flüssigen Massen gefüllt, die Peyerschen Plaques bis linsengroß, nahmen stellenweise den größten Teil des Darmlumens ein, deren Oberfläche war mit kleinen lochförmigen Substanzverlusten wie mit Stecknadelstichen dicht besät.

Das Coecum enorm dilatiert, in demselben breiige, gelblich-grüne Kotmassen, ebensolche im Dickdarm; in letzterem nirgends geformter Kot. Die Milz auf das 5—10fache ihres Normalvolumens vergrößert, die Pulpa weich, leicht zerreißlich, sehr blutreich. Die Leber etwas vergrößert, sehr blutreich. Die Mesenterialdrüsen beträchtlich vergrößert, bis zu Stecknadelkopf- und Hirsekorngröße. Das Herz klein, schlaff. Die Lungen stellenweise hyperämisch, jedoch lufthaltig.

Aus dem Darne wurden spärliche Typhusbacillen gezüchtet, ebenso aus der Milz. Die Kolonien wuchsen sehr langsam, entwickelten sich spät und spärlich. Agarstrichkulturen aus der Milz zeigten bei 37° erst am 3. Tage spärliche, vereinzelt stehende Kolonien. Die Bacillen waren wenig beweglich. Agglomeration wie beim Ausgangsmaterial mit

demselben Typhusimmunserum 1:15000; eine weitere Ueberimpfung dieser Bacillen auf Nährböden gelang überhaupt nicht mehr.

Bei diesen Versuchen¹⁾ fällt sofort der ganz beträchtliche Unterschied auf, welcher zwischen der Erkrankung der Ratten durch Typhusbacillen und der durch Coli-Bacillen hervorgerufenen besteht. Zweifellos waren die durch Eier gezüchteten Typhusbacillen ungleich weniger virulent für Ratten als die in gleicher Weise gezüchteten Coli-Bacillen. Ob nicht die Virulenz der Typhusbacillen für Ratten durch andere Methoden gesteigert werden kann, muß vorläufig dahingestellt bleiben.

Daß aber trotzdem eine tödliche Infektion, wenn auch nach einer weiteren späteren Darreichung, also durch eine Additionalinfektion, erfolgte, beweist, daß die Ratten an Typhusinfektion erkranken können, welche unter Umständen ein Sektionsbild hervorruft, welches von dem der charakteristischen Typhusinfektion beim Menschen fast gar nicht abweicht, während das durch virulente Danysz- oder andere Colikulturen hervorgerufene Bild wesentlich anders erscheint. Bei letzterem treten doch zumeist die Erscheinungen einer Septikämie in den Vordergrund, und zwar um so deutlicher, je kürzer die Krankheitsdauer war.

Rattenepizootien werden nach diesen Ergebnissen durch vom Menschen stammende Typhuskulturen vorläufig kaum hervorgerufen werden können, wohl aber wird man die Frage aufwerfen müssen, ob die Ratten nicht etwa bei Verbreitung von Typhusepidemien eine gewisse Rolle spielen. Denn bei dem Umstande, als diese gefräßigen Tiere in den Kanälen den menschlichen Kot durchwühlen, die etwa verschlungenen menschlichen Typhusbacillen 1 Monat und länger mit sich herumtragen und mit ihren Exkrementen an den verschiedensten Orten deponieren können, ist der Gedanke gewiß nicht von der Hand zu weisen, daß Nahrungsmittel oder Trinkwasser, durch Vermittelung der Ratten infiziert, dann von Menschen aufgenommen werden und bei denselben eine Infektion hervorrufen können.

Nachdruck verboten.

Ueber einen ziemlich seltenen Tuberkelsputumbefund.

[Hygienisches Institut der Königl. Universität Turin. Direktor: Prof. L. Pagliani.]

Von Dr. E. Bertarelli, Privatdozent.

In dem von einem Schwindsüchtigen des Spitals S. Luigi zu Turin entstammenden Tuberkelsputum, das unter die Schüler des Laboratoriums zu den gewöhnlichen Uebungen verteilt worden war, konnte ich einen ziemlich außergewöhnlichen bakteriologischen Befund verzeichnen, der kurz angedeutet zu werden verdient.

Das Sputum kam von dem 30-jährigen Gesangskünstler O. G., der an sehr schwerer Lungentuberkulose litt und nicht lange nach der Prüfung nachbeschriebenen Sputums verstarb. Dieses Sputum hatte nun auf den ersten Blick den gewöhnlichen Charakter des Tuberkelsputums, sofort aber nach den ersten, von den Schülern hergerichteten Präpa-

1) Dieselben werden nach jeder Richtung fortgesetzt.

raten ließ sich feststellen, daß es eine absolute Reinkultur von Tuberkelbacillen war. Die gewöhnlichen Elemente (Leukocyten, elastische Fasern etc.) des tuberkulösen Auswurfs fehlen fast vollständig, im Gesichtsfelde aller Präparate fanden sich nur Myriaden von typischen Kochschen Bacillen. Im Durchschnitt konnte man einige Tausend auf jedem mikroskopischen Felde zählen. Die Bacillen selbst waren eher kurz und ziemlich zerstückt. Bei der Färbung (Färbung nach Ziehl und Differentialfärbung Baumgartens) war ihr Verhalten das der Tuberkelbacillen im allgemeinen.

Beobachtete man das Sputum jedoch etwas aufmerksamer, so war es nicht schwer, in dem Schleime kugelförmige Körperchen von blaßgelber, zuweilen gräulicher Farbe zu erblicken, die sofort an die charakteristischen Anschwemmungen des *Actinomyces bovis* in den Tumoren des Rindes erinnerten. Diese Kügelchen waren ziemlich resistent und konnten im Wasser leicht so lange geschlagen werden, bis der sie umgebende Schleim vollständig abgewaschen war. Drückte man sie zusammen, so zeigte sich dabei eine typische talgartige Widerstandsfähigkeit; unter dem Mikroskope wurden sie als starkdichte Anhäufungen von ziemlich zerstückten Tuberkelbacillen erkannt.

Solche Kügelchen oder Bacillarzoogloen waren in großer Zahl vorhanden. Ihr Durchmesser schwankt zwischen der Größe eines Senfsamenkornes und der eines großen Hirsekornes.

An den 2 nachfolgenden Morgen fand sich noch eine große Anzahl solcher Kügelchen; der Sputumbefund war konstant der einer wirklichen Tuberkelbacillen-Reinkultur.

Mit derartigem Sputum versuchte ich eine kulturelle Isolierung auf glyceriniertem Serum und Blutagar; vermitteltst Ausstrichen mit der Oese entnommener und in sterilisiertem Wasser gewaschener Kügelchen erhielt ich ohne Schwierigkeit eine typische Tuberkelbacillenkultur. Die an Meerschweinchen vorgenommene subkutane Injektion bestätigte ebenso unzweifelhaft die tuberkulöse Natur des Sputums.

Ein derartiger Befund scheint mir nun zum mindesten nicht gar oft beobachtet worden zu sein. Einige Autoren sprechen zwar von tuberkulösem Sputum mit äußerst zahlreichen Kochschen Bacillen und auch im Handbuch von Flügge findet sich eine hierauf bezügliche interessante Abbildung, aber der Fall eines Sputums (und das meine war sofort vom Patienten weg examiniert worden), das eine wahre und volle Reinkultur darstellt, darf zweifellos als sehr selten bezeichnet werden. Der Befund selbst bereitet nun (wenigstens hinsichtlich der überaus großen Anzahl von Bacillen) natürlich keine Interpretationsschwierigkeiten.

Schwieriger ist schon zu erklären das Warum der kugelartigen, Bacillarzoogloen bildenden Körperchen, die nur schlecht mit dem phthisogenen Invasionsprozeß im Lungengewebe zusammenpassen. Interessant bleibt die Tatsache nun aber gerade, wenn man sich vergegenwärtigt, daß dieser Befund einen neuen Beitrag liefert zu Annäherung der Tuberkelbacillen an die Gruppe der Streptothricheen und besonders an die Familie *Actinomyces*, eben weil dadurch zu Tage tritt, daß in seltenen Fällen auch der Tuberkelbacillus im Organismus die typische Disposition von kugeligen Anhäufungen annehmen kann, die der Rinderaktinomykose eigen ist.

Les Epithéliomas parasitaires. La clavelée et l'Epithélioma claveleux.

Par F. J. Bosc, Professeur à l'université de Montpellier.

Avec 3 planches et 6 figures.

Aucune des preuves regardées comme nécessaires pour établir la nature parasitaire d'une maladie n'a pu être fournie pour le cancer: Les cultures sont demeurées infructueuses, les inoculations ont été à peu près constamment négatives et, parmi les figures observées dans les tissus cancéreux on n'en a point trouvées qui soient considérées comme définitivement caractéristiques d'un parasite.

On pourrait expliquer cet échec par la difficulté extrême des recherches et il serait possible de mettre en avant des faits favorables à la théorie parasitaire et qui relèvent de l'expérimentation comme de l'étiologie et de la symptomatologie. Mais la valeur de ces faits se trouve diminuée par l'étude microscopique des tumeurs qui montre que les caractères histologiques des néoplasies cancéreuses demeurent tout à fait spéciaux et ne peuvent être comparés à aucun des processus que les parasites connus sont susceptibles de produire. C'est ce qui a fait dire que „tant qu'on n'aura pas montré que des parasites sont capables de déterminer, dans les tissus, des réactions susceptibles d'aboutir à une néoformation de tissu épithélial, l'hypothèse de la nature parasitaire des cancers épithéliaux ne possède aucun fondement à son actif" (Cazin).

Depuis 1896 nous avons commencé nos recherches pour savoir s'il n'existait pas, chez l'homme ou les animaux, un type morbide qui, de nature indiscutablement parasitaire, présentât des lésions identiques à celles du cancer.

L'examen des faits nous amena tout d'abord à admettre que si, parmi les parasites connus, certains peuvent exciter à un haut degré la prolifération des cellules, aucun n'est susceptible de donner naissance à des proliférations épithéliales de même ordre que celles du cancer. Nous pensâmes alors à faire porter nos recherches sur ces maladies qui, comme la variole, la vaccine, la fièvre aphteuse, la syphilis... sont essentiellement virulentes mais dont le parasite, malgré son abondance dans les lésions, avait échappé cependant à toutes les investigations.

Nous remarquâmes que toutes ces maladies non classées et si disparates au premier abord sont rapprochées par des traits spéciaux de leur symptomatologie et de leur évolution, en particulier par la formation de petites tumeurs capables de se généraliser et que l'on désigne sous le nom de pustules. L'étude histologique des pustules de variole et de vaccine nous montra alors, comme lésion essentielle, une prolifération épithéliale à tendance envahissante et désorientée, avec formation de globes épidermiques. Mais ces lésions étaient trop peu étendues et trop fugaces. En cherchant parmi les maladies similaires, la clavelée ou variole du mouton nous frappa par le volume et la durée des lésions. L'étude des pustules claveleuses cutanées nous montra que les lésions étaient caractérisées par une prolifération épithéliale qui revêtait les caractères typiques de l'épithélioma malpighien et qu'elles renfermaient des inclusions de même ordre que celles qui existent dans la vaccine, dans la variole et dans les cancers épithéliaux. Dès 1901 nous exposons nos recherches dans un premier mémoire (Archives de médecine expérimentale. Mai 1901)

et, alors que le fait n'était soupçonné de personne, nous établissions, en nous basant non seulement sur les inclusions mais sur l'étude des lésions, l'existence d'un groupe de maladies parasitaires capables de produire les lésions du cancer épithélial et nous faisons entrer le cancer dans le cadre des maladies virulentes inflammatoires. Quand donc Borrel vient déclarer dans un mémoire du 25 février 1903 que nous n'avons songé à grouper les maladies qu'en tenant compte de la présence de parasites „douteux“ et quand il veut, après toutes nos publications de 1902 et notre article documenté de la Presse médicale (14 fév. 1903), se donner le mérite de faire un groupement en rapport avec les lésions, notre mémoire de 1901 oppose le démenti le plus formel à ses insinuations.

Je ne citerai, entre vingt, qu'un passage de ce mémoire de 1901: „Nous avons fait remarquer avec insistance la similitude des néoformations épithéliales, dans la variole, dans la vaccine et surtout dans la clavelée avec l'épithélioma cutané. Plus l'évolution des pustules est lente et à l'abri de l'infection microbienne et plus leur coupe ressemble à celle d'une coupe d'épithélioma; les globes épidermiques peuvent être excessivement nombreux au point de se toucher presque“ (p. 305).

Poursuivant méthodiquement nos recherches nous abordons dès le mois d'avril 1901, après l'étude des pustules cutanées et cornéennes celle des pustules claveleuses de généralisation dans les divers organes en particulier dans le poumon, l'estomac et le foie. Déjà nous avons noté en passant, le caractère spécial de la lésion pulmonaire. „Les nodules broncho-pneumoniques ont l'aspect de grains de sagou ou de noyaux nacrés, brillants, durs, enchâssés dans le tissu pulmonaire . . . au microscope il s'agit d'un processus particulier de pneumonie proliférative. Dans les cellules épithéliales des alvéoles hyperplasiées ou rencontre des inclusions . . .“ (p. 272). Une expérimentation très étendue portant sur plus de 100 moutons nous permit de recueillir, dans les conditions les plus variées, un matériel très considérable. Après dix mois de recherches microscopiques suivies, nous exposons, le 1^{er} février 1902, dans trois communications à la Société de biologie, le résumé de nos résultats. Nous montrions que les lésions pustuleuses des organes sont, aussi nettement que celles de la peau, caractérisées par une prolifération épithéliale capable d'aboutir à l'adénome et à l'adéno-épithéliome¹⁾. Nous montrions également qu'il existe, dans le protoplasma des cellules proliférées, des inclusions abondantes, d'une structure précise et dont la nature parasitaire était vraisemblable.

Dans le cours de l'année 1902 nous démontrions (notes à la Soc. de biologie) que le virus claveleux peut déterminer des tumeurs véritables, en particulier dans la mamelle, et réaliser, au point de vue histologique non seulement des proliférations épithéliales glandulaires, caractéristiques de l'adénome et de l'adéno-épithéliome mais des formations néoplasiques épithéliomateuses typiques et même atypiques (épithéliome et carcinome claveleux). Nous établissions également la virulence du sang, la formule leucocytaire, le mode d'évolution des lésions et arrivions à la conception du rôle défensif de la prolifération épithéliale qui constitue la tumeur.

1) Nous montrions ce même jour, à la Société de Biologie et au Professeur Cornil, dans son Laboratoire, notre série de préparations; nous eûmes le plaisir de constater que l'opinion que nous avions émise dix mois auparavant, était acceptée avec faveur.

Nous aboutissons ainsi à cette conclusion légitime: Il existe un Epithélioma claveleux et, comme le virus claveleux produit une maladie générale et provoque, dans tous les points de l'organisme où il pénètre une réaction prolifératrice de caractère néoplasique, cet épithélioma ouvre bien le groupe des Epithéliomas parasitaires.

Nous avons tenu à présenter ce résumé de nos recherches pour en montrer la portée générale et pour en établir la filiation¹⁾, pour établir, en particulier, que nos études histologiques sur les pustules de la variole, de la vaccine et de la clavelée (memoire de 1901) demeurent l'unique et solide point de départ de toutes nos recherches consécutives et des recherches des autres auteurs. Elles nous ont permis de constituer un nouveau groupe morbide, de rattacher au processus inflammatoire des proliférations purement épithéliales, de réunir dans un même groupe des maladies en apparence très dissemblables, enfin de faire entrer le cancer dans les maladies parasitaires. Nous avons fait l'exposé général de nos idées dans le mémoire de la Presse médicale que nous indiquions plus haut (14 février 1903).

Nous diviserons ce travail en trois parties: dans la première nous étudierons les lésions claveleuses; dans la seconde nous nous occuperons du virus claveleux et de la recherche du parasite; dans la troisième, nous envisagerons la signification des proliférations épithéliales et la place que doit occuper le cancer dans l'ensemble du processus inflammatoire.

I. Les lésions.

La clavelée est une maladie virulente qui débute par un accident local (pustule, chancre, tumeur d'inoculation) et qui, le plus souvent, se généralise à toute l'économie par la voie sanguine (septicémie) pour donner naissance à une éruption de pustules. Ces pustules peuvent se généraliser à tous les organes et à tous les tissus avec une intensité variable pour tel organe suivant la porte d'entrée du virus; mais la lésion pustuleuse peut être limitée à l'accident local. L'activité du virus et la résistance de l'animal sont des conditions importantes pour l'évolution et les caractères histologiques de ces lésions; c'est ainsi que nous avons obtenu les plus belles lésions épithéliomateuses du poumon chez un mouton résistant qui ne mourut qu'au trentième jour après l'inoculation d'un virus très actif.

Technique générale.

1. Pour les coupes: fixations de fragments de tissus vivants dans le Flemming fort, le Tellyesniczki et le sublimé.

A. Après le Flemming nous avons usé des colorations suivantes:

a) Safranine anilinée ou phéniquée suivie de picro-indigo-carmin: on laisse agir la première 15 minutes, la seconde 5 à 10 minutes après chauffage jusqu'à vapeurs; laver à grande eau, colorer 20 minutes à froid ou 5 minutes à chaud avec la solution de picro-indigo-carmin,

solution aqueuse saturée d'acide picrique, un volume
de carmin d'indigo en poudre, deux volumes

laver, passer " la série " des alcools rapidement, enlever l'excès de safranine à l'alcool absolu, achever la décoloration par l'essence de girofle, en suivant au microscope; monter dans le baume.

b) Rouge de magenta phéniqué suivi de picro-indigo-carmin: suivre les mêmes règles que pour la méthode précédente, en évitant de laisser agir le rouge plus de cinq minutes, si on chauffe.

1) Nous sommes bien obligé d'établir les faits lorsque l'on constate les efforts que fait Borrel dans un mémoire cependant tout récent (Ann. Inst. Pasteur, 25 fév. 1903) pour s'attribuer, en ne nous citant même pas, tout le mérite de ces recherches.

c) La safranine-induline donne les mêmes résultats (voir F. J. Bosc, Le cancer. Paris 1898).

d) La méthode de Benda modifiée de la façon suivante donne les meilleurs résultats: colorer avec le rouge de magenta phénique, cinq minutes, après chauffage jusqu'à vapeurs; laver; faire agir la solution de vert lumière,

Vert lumière	2 grammes	50
Eau distillée	100 cent.	cubes
Alcool à 90° C	100	"

tant que la coupe cède du rouge; sécher au buvard, décolorer à l'alcool absolu, puis achever la décoloration à l'essence de Bergamote, en suivant au microscope; monter dans le baume. Le rouge de magenta phéniqué se fixe très fortement et on peut suivre, à l'aise, la décoloration et l'amener au point que l'on veut.

B. Après le Tellyesniczki, la coloration de choix est celle de l'hématoxyline ferrique suivie d'éosine ou de van Gieson. La méthode rapide suivante donnera de bons résultats: alun ferrique, dix minutes après deux chauffages jusqu'à vapeur; laver à l'eau attentivement; hématoxyline 15 minutes, après chauffage; laver, décolorer par l'alun ferrique à froid, en suivant au microscope; laver, colorer par l'éosine ou le van Gieson dedouble: On peut employer également la coloration par la safranine et le picro-indigo-carmin, mais les résultats sont médiocres. Le triacide d'Ehrlich donne de bons résultats.

C. Fixations par le sublimé. Les colorations de choix sont l'hématéine suivie d'éosine ou de van Gieson, le triacide d'Ehrlich, la thionine phéniquée et, en général, toutes les colorations microbiennes. Pour le triacide on suivra les règles que nous avons déjà indiquées (Soc. de biol. et Arch. de méd. exp. Mai. 1901).

2. Râclages de pustule fixés sur lamelles. — Après avoir rasé très soigneusement une pustule claveuse cutanée au 8. jour, ou enlève, en frottant avec un couteau, la couche épidermique superficielle nécrosée; la surface mise et qui représente la prolifération épithéliale fournit, par un râclage délicat avec un rasoir très effilé, une fine émulsion de cellules épithéliales. Ce produit de râclage est étalé rapidement en couche très mince sur une lamelle qui aussitôt, car il est essentiel de ne pas provoquer de dessiccation, est retournée sur du Flemming fort où on la laisse surnager 48 heures. On préparera ainsi un assez grand nombre de lamelles car une partie de l'enduit peut se détacher au moment de l'immersion dans le Flemming et ce n'est qu'après coloration que l'on pourra juger des préparations utilisables. Après séjour dans le Flemming, lavage à l'eau de 24 heures, coloration par la safranine anilinée ou phéniquée ou le R. de magenta suivis de picro-indigo-carmin. Cette méthode que nous employons méthodiquement depuis 1898 donne des préparations parfaites au point de vue de la netteté de la fixation des cellules et des inclusions et de l'élection précise de la safranine, si l'on porte une grande attention à la décoloration.

La méthode de Laveran ne donne ici que de mauvais résultats: la dessiccation préalable déforme complètement les inclusions et peut permettre toutes les interprétations ainsi que le démontrent les figures publiées par Borrel¹⁾.

A côté des lésions pustuleuses limitées qui sont la manifestation de l'action directe du virus, la clavele produit des lésions dégénératives intenses et étendues, probablement d'ordre toxique et que nous n'étudierons pas ici²⁾.

Quelle que soit leur localisation, les pustules présentent toutes un caractère histologique fondamental qui est la prolifération suivie de désorientation des cellules épithéliales. Nous limiterons notre étude actuelle aux néoformations claveuses à point de départ épithélial, réservant pour une publication ultérieure l'étude des pustules et des tumeurs à point de départ conjonctif.

1) Nous aurions été heureux de voir Borrel, lorsqu'il rapporte cette méthode de la fixation des râclages par le Flemming, nous citer. Nous l'avions indiquée en partie dans notre note du 1^{er} février 1902 à la Société de biologie, nous réservant d'y revenir dans notre Mémoire général; en outre, le 1^{er} février 1902, à l'Institut Pasteur, alors que Borrel soutenait que cette méthode que nous lui indiquions ne pouvait donner que des figures fausses dûes à l'éclatement en boule des leucocytes tandis que la méthode de Laveran était parfaite, nous lui affirmions au contraire que la méthode de Laveran ne donnait ici que des fixations très mauvaises à cause de la dessiccation préalable. Nous voyons avec plaisir que Borrel est revenu, dans son mémoire, de sa 1^{re} opinion.

2) Nous renvoyons pour l'étude symptomatique et lésionnelle complète de la clavele à un mémoire général qui paraîtra bientôt.

A. Lésions cutanées.

La pustule d'inoculation cutanée débute vers le milieu du 3^e jour par une macule qui au 4. jour devient saillante. Au 7. jour, la pustule a le diamètre d'une pièce de un et de 2 francs, parfois de 5 francs (face inférieure de la queue près de l'anus); elle fait une saillie en bouclier, présente une surface lisse, tendue, violacée au centre, rouge sombre sur les bords. Jusqu'au 9^e ou 10. jour, la pustule est dure puis elle se ramollit suivant un processus vésiculeux; elle s'élimine par dessiccation ou par nécrose humide du 18. au 25. jour.

Sur la coupe, la pustule, au 8. jour, présente l'aspect d'une véritable petite tumeur qui d'abord née de l'épithélium (examen au 3., 4. et 5. jours) fait saillie au dehors, en même temps qu'elle pénètre profondément dans le tissu conjonctif sous jacent.

Examen histologique. Le début se marque par une prolifération épithéliale qui se fait aux dépens des cellules malpighiennes de la couche de revêtement. Lors que la pustule est arrivée à son plein développement, elle est constituée (figure 1) surtout, par la prolifération épithéliale qui porte maintenant non seulement sur l'épithélium de revêtement, mais sur l'épithélium des glandes sébacées ayant fait retour au type malpighien (*seb*, figure 1). A la périphérie on voit progresser la pustule aux dépens de l'épithélium normal qui donne naissance à des formations papillomateuses; celles-ci se réunissent s'étendent et forment de larges nappes épithéliales dont les bourgeonnements profonds pénètrent le tissu conjonctif en transformation embryonnaire. Autour de ces bourgeonnements les plus profonds de la partie centrale (la plus avancée) de la pustule, la membrane basale et la couche bordante des cellules prismatiques peuvent avoir totalement disparu (figure 1, *proli*). Les cellules désorientées dans toute l'étendue de la prolifération et jusque sur les bords des bourgeons profonds, avec des karyokinèses à direction, anormale pénètrent, en ces points, les espaces conjonctifs sous forme de pointes, d'amas, ou de lobules isolés (figure 1, *tra*, *tra* et *lobu*, *lobu*). Si l'on suit l'évolution des lésions cellulaires on constate que les cellules présentent une hypertrophie claire, parfois colossale, et subissent un processus intense de kératinisation non seulement vers la surface (figure 1, *de*, *de*) mais encore sous forme de foyers nombreux qui aboutissent à la formation de sphères, de globes épidermiques (*glo*, *glo*, figure 1) de placards kératiques et à une désorientation totale. Une partie des cellules en transformation claire subissent un processus de dégénérescence aqueuse ou kératohydropique aboutissant à leur destruction et à la formation de vésicules (*ve*, *ve*, *ves*, figure 1).

Dans l'intervalle des bourgeons épithéliaux, le tissu conjonctif infiltré de lymphes (*ed*, figure 1), renferme d'énormes cellules irrégulières (*cla*, figure 1) que nous avons déjà décrites et figurées dans notre mémoire de Mai 1901; ce sont des cellules d'origine conjonctives (cellules fixes et cellules endothéliales) que nous avons désignées sous le nom de grandes cellules claveleuses (C. R. Soc. Biol. 2 fév. 1902) [*cl*, fig. 17, pl. II]. Elles peuvent s'entasser dans les espaces conjonctifs dissociés et prendre un aspect épithélial (*teo*, *teor*, figure 1) au point qu'il est très difficile de les distinguer des bourgeons épithéliaux voisins. Le tissu conjonctif renferme également à partir du 5. jour surtout des mononucléaires de moyen et de grand volume, des lymphocytes (*mo*, figure 17, pl. II) et des mastzellen. Les vaisseaux anciens et les nombreux vaisseaux de nouvelle formation sont le siège d'un processus très actif d'endopérivasculite (*va*, figure 1). Les glandes sudoripares présentent également des lésions de prolifération épithéliale (*sudo*, figure 1).

Il est utile d'étudier les plus importantes de ces lésions, à un fort grossissement:

a) Hypertrophie et transformation claire. — Dès leur division, les cellules épithéliales s'hypertrophient et deviennent claires et réfringentes; le réticulum protoplasmique devient de plus en plus fin puis se désagrège en certains points (voyez les cellules de la fig. 15, pl. II) pour aboutir à la formation d'une ou plusieurs vacuoles (*a*, fig. 15, pl. II) qui se réunissant constituent la grande cellule hydropique à gros noyau vésiculeux. Cette cellule, lorsqu'elle n'a pas subi de dégénérescence kératique, aboutit à la destruction vésiculeuse totale (dégénérescence aqueuse ou granuleuse) [*ve*, *ves*, fig. 1, pl. I].

b) La transformation cornée vers la surface (figure 1 et pl. I, fig. 1) est, de tous points, comparable à celle que l'on observe dans l'épithélioma pavimenteux: le spongioplasma des cellules malpighiennes se condense, devient filamenteux et opaque, les filaments de passage s'épaississent, la chromatine du noyau forme une masse hyperchromatique (*c*, *c*, fig. 1, pl. I) qui diminue en suite de volume et se disperse dans le protoplasma en fines granulations (*d*, *d*, fig. 1, pl. I). Arrivées vers la surface, les

cellules s'aplatissent, perdent toute trace de noyau et s'éliminent sous forme de lamelles cornées (*co, co*, fig. 1. pl. I). Un grand nombre de cellules subissent en même temps que la transformation kératique, une hydropisie partielle ou totale qui dissocie les filaments protoplasmiques et peut faire subir à la cellule entourée par une coque kératique, dûe en partie à la condensation des filaments de passage, une distension utriculaire (dégenérescence kérato-hydropique).

c) Foyers de kératinisation, sphérules et globes épidermiques; désorientation: La désorientation des cellules proliférées se marque dès le début;

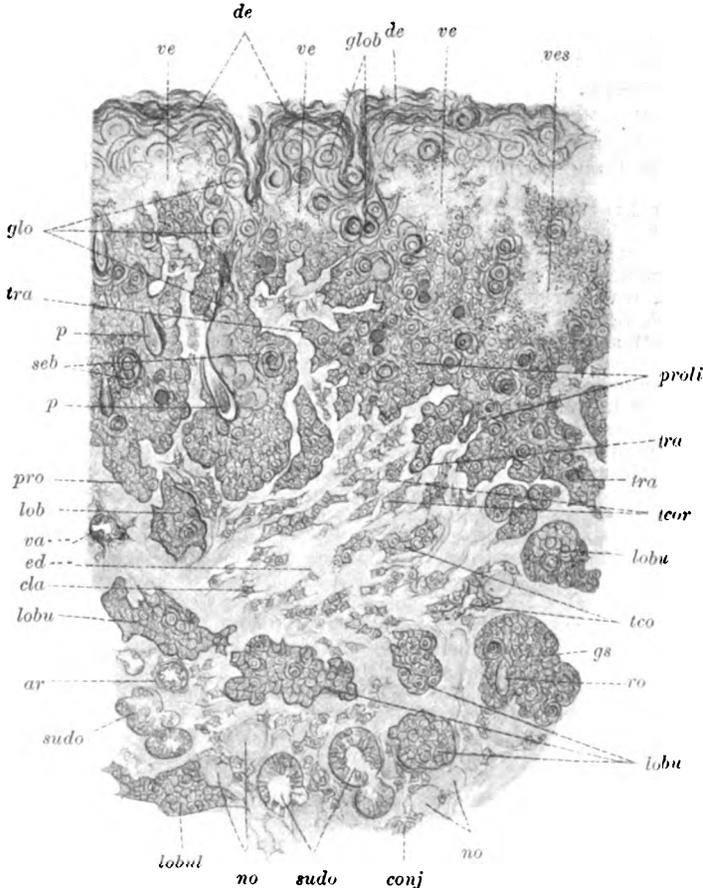


Figure 1. Coupe de pustule cutanée au 13 jour. — *de, de* desquamation cornée superficielle; *ve* vésiculation; *ves* vésiculation profonde microbienne; *glo, glob* globes épidermiques et foyers de kératinisation se prolongeant dans la profondeur de la prolifération épithéliale; *seb* prolifération des cellules des glandes sébuleuses ayant fait retour complet au type malpighien, présentant de nombreux globes et se confondant avec la prolifération de l'épithélium de revêtement pour former de vastes nappes épithéliales à bourgeonnement profond (*pro*); *proli* prolifération en nappes très profondes, désorientées à nombreux globes épidermiques et pénétrant les espaces conjonctifs sous forme de bourgeons, de traînées, de traînées de basale (*tra, tra, tra*); *teor* boyaux formés de grandes cellules clavelouses qu'il est difficile de différencier des boyaux épithéliaux; *ed* tissu conjonctif oedématisé renfermant de grandes cellules clavelouses isolées (*cla*) ou réunies en amas dans les espaces conjonctifs (*teo*); *gs* prolifération épithéliale à globes épidermiques développée aux dépens de la gaine d'un poil profond (*po*); *lobu, lobu* lobules épithéliaux profonds à globes épidermiques, dépourvus de basale; *lobul* lobule épithélial très profond nettement développé dans un espace conjonctif; *suda* glandes sudoripares dilatées à épithélium proliféré; *no, no* nodules tissu conjonctif deux; *conj* grandes cellules clavelouse profondes; *va* vaisseau avec endopérivascularite intense; *ar* artère.

elle trouve son expression la plus élevée dans les sphérules et les globes épidermiques volumineux parfois tellement abondants qu'ils sont en contact les uns avec les autres sur toute l'étendue de la coupe (figure 1 et pl. I, fig. 1, *glo*). Ces globes ne présentent aucune différence de structure avec ceux qui existent dans les epithéliomas malpighiens lobulés et, on peut suivre toutes les modifications que l'on a décrites dans les globes des epithéliomas (aspect de la cellule centrale et des cellules imbriquées, dégénérescence kératocolloïde d'une ou plusieurs des cellules centrales ou transformation hydropique, globes composés . . . etc.).

d) La dégénérescence colloïdo-cornée peut atteindre non seulement la cellule centrale des globes, mais encore des cellules isolées, des amas ou des traînées de cellules. Elle peut être partielle ou bien totale, figeant la cellule dans sa forme (x, fig. 1, pl. I) ou déterminant, par liquéfaction, la formation de figures pseudopodiques.

e) Les inclusions d'une cellule dans une autre sont fréquentes; la cellule incluse peut subir une dégénération colloïdo-cornée constituant un petit bloc qui prend l'apparence d'un corps intracellulaire.

Nous insistons sur les lésions du noyau des cellules épithéliales qui se marquent dès le début de l'hypertrophie cellulaire. Elles consistent essentiellement en une distension vésiculeuse avec condensation de la chromatine (fig. 1 à 16, pl. II). Dans le noyau vésiculeux les filaments du réseau chromatique s'étirent, se rompent, se condensent en une ou plusieurs boules opaques ou s'étalent en anneau sur la face interne de la membrane. Les boules finissent par ne plus se laisser colorer par les colorant nucléaires, puis la membrane se plisse (*np*, fig. 1, pl. I) vidant son contenu dans la vacuole protoplasmique.

Les lésions du noyau de la grande cellule claveluse conjonctive (*n*, *nr*, fig. 17, pl. II) sont identiques aux précédentes de même que les lésions de la cellule dans son ensemble (C. R. Soc. Biol. 2 fév. 1903).

On voit donc que les lésions de la pustule cutanée d'inoculation aboutissent à la formation d'un véritable epithélioma pavimenteux à globes épidermiques. Les pustules de généralisation développées au niveau des commissures labiales ou de la langue donnent, dans le cas où elles sont bien développées, des figures encore plus démonstratives que celles de la pustule d'inoculation.

B. Lésions de la cornée.

Nous avons étudié des pustules spontanées bien préférables pour l'étude aux pustules cornéennes d'inoculation: formant d'abord une tache opaline elles font une saillie qui devient blanchâtre et peut prendre le volume d'une très grosse lentille.

Au microscope, on constate ici facilement que le début de la prolifération est strictement épithélial. L'épithélium prolifère et forme des bourgeons qui se réunissent, constituent des nappes épithéliales lesquelles envoient dans tous les sens, à travers les lames cornéennes, des prolongements filiformes ou ramifiés, des bourgeons et des lobules. Bientôt la cornée se vascularise et la pénétration des bourgeonnements cellulaires est précédée par une transformation embryonnaire néovasculaire.

On constate au niveau de ces néoformations épithéliales, les mêmes lésions des cellules que pour la peau: hypertrophie claire, transformation kératique vers la surface, désorientation avec évolution de foyers kératiques vers le globe épidermique typique, dégénérescences kératocolloïde et vésiculeuse. La disparition précoce de la basale, et des cellules prismatiques bordantes, la désorientation des cellules dans tous les points de la prolifération, le caractère envahissant de cette prolifération épithéliale sous forme de pointes, de bourgeons et de lobules qui pénètrent dans tous les sens les espaces cornéens, évoquent les caractères histologiques les plus précis de epithélioma pavimenteux.

C. Lésions de l'estomac.

Elles siègent surtout au niveau du rumen; elles sont assez fréquentes au niveau de la caillette.

1. Rumen. On peut dire que toutes les fois où il y a une éruption cutanée généralisée, il existe, à partir du 12^e jour, une éruption pustuleuse du rumen. La surface interne de la cavité présente de belles pustules arrondies, dures, formant une saillie plate et qui se détachent

par leur couleur blanche et leur aspect lisse sur le fond brun et vilieux de la muqueuse. Elles sont du diamètre d'une lentille à celui d'une pièce de un franc; elles sont isolées ou agminées en placards gaufrés; dans deux cas, nous les avons vues confluentes, sur toute la surface de l'estomac. Les plus volumineuses présentent une ombilication et parfois une légère exulcération centrales. Elles ne sont entourées d'aucune zone congestive de sorte que certains estomacs claveux rappellent très nettement la zone de progression papuleuse de certains cancers de l'estomac, chez l'homme.

À l'examen histologique, la muqueuse du rumen étant un revêtement du type malpighien, nous retrouvons ici (figure 2) les lésions de la pustule cutanée mais à un degré d'intensité et de netteté encore plus prononcé (C. R. Soc. Biol. 2 fév. 1902). La prolifération débute au niveau de l'épithélium des villosités; celles-ci s'épaississent, défilissent et se confondent superficiellement en une seule masse saillante tout en envoyant dans la profondeur de volumineux bourgeons papillomateux. Au niveau des pustules bien développées on a ainsi de vastes surfaces épithéliales en évolution kératique intense vers la surface et qui dans leur épaisseur présentent une désorientation cellulaire tellement prononcée que les sphérules et d'énormes globes épidermiques, se touchent, se pénètrent (figure 2), se compriment entraînant les cellules intermédiaires dans les

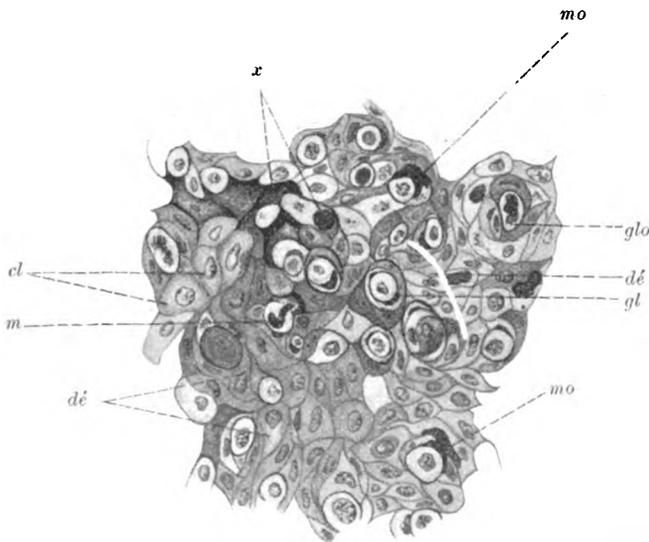


Figure 2. Coupe d'une pustule de l'estomac (rumen). — Elle est constituée par une prolifération épithéliale malpighienne complètement désorientée et criblée de globes épidermiques (*gl*, *glo*) dont certaines cellules en dégénérescence kérato-colloïde se liquéfient pour former des corps pseudopodiques intercellulaires (*mo*, *mo*); parfois le produit de dégénérescence intracellulaire s'étire hors de la cellule (*m*); *cl* grandes cellules claires; *dé*, *dé* cellules désorientées.

directions les plus diverses. Les inclusions de cellules épithéliales sont extrêmement nombreuses; les dégénérescences vésiculeuse, kérato-colloïde et colloïde y sont très actives (*mo*, *x* figure 2) et donnent naissance à des formations pseudopodique inter (*mo*, *mo* figure 2) ou intracellulaires (*m* figure 2). Dans la profondeur, la disparition de la basale, la désorientation des cellules bordantes et des karyokinèses, permettent de constater avec une netteté plus grande qu'au niveau de la peau la pénétration profonde de la prolifération épithéliale sous forme de bourgeons de pointes, d'amas et de lobules isolés. C'est au niveau des pustules du rumen que la transformation embryonnaire qui accompagne l'envahissement épithéliale mérite d'être étudiée, par son intensité et par l'abondance des neoformations vasculaires avec endoperivascularite.

(Fortsetzung folgt.)

Nachdruck verboten.

Ueber Immunisierung mit Diphtheriebacillen.

[Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.,
Direktor Geh. Med.-Rat Prof. P. Ehrlich.]

Von Dr. A. Lipstein, ehemaligen Assistenten der bakteriol. Abteilung.

In einer früheren Mitteilung¹⁾ über dasselbe Thema habe ich einige Versuche, die Agglutination der Diphtheriebacillen betreffend, veröffentlicht. Das zur Agglutination verwendete Immuneserum wurde von Kaninchen gewonnen, welche gegen Diphtheriebacillen immunisiert waren, und zwar derart, daß steigende Mengen von Diphtheriebacillen, mit antitoxischem Serum versetzt, intraperitoneal injiziert wurden. Der Zusatz von Antitoxin war unbedingt nötig, weil anders die Kaninchen der Wirkung des von den eingespritzten Bacillen gebildeten Diphtherietoxins erliegen; weiter sollte durch diese Methode verhindert werden, daß reaktiv im Kaninchenkörper Antitoxin gebildet wird, um ein antitoxinfreies, nur gegen die Bacillenleiber gerichtetes Immuneserum zu erhalten. Einen ähnlichen Weg ging Wassermann²⁾, als er nach Einspritzung eines Aethylendiaminextraktes aus zerriebenen Diphtheriebacillenleibern unter Zusatz von Antitoxin ein Kaninchen-Serum gewann, welches mit dem Auszug der Bacillenleiber deutliche Präzipitierungsreaktion ergab. Wie das hier wiedergegebene Immunisierungsprotokoll zeigt, darf man die Immunisierung mit großen Mengen lebender Kultur beginnen und dieselben in rascher Aufeinanderfolge steigern. Die zum Immunisieren verwendete DB.-Kultur No. 3 ist für Meerschweinchen sehr virulent und tötet bei subkutaner Infektion in der Menge von $\frac{1}{80}$ Oese Meerschweinchen von 250 g Gewicht.

Immunisierungsprotokoll.

Das Kaninchen erhält am:

4. XI. 1902	$\frac{1}{2}$ Agarkultur DB. No. 3 ^{b)}	+ 400 Immunitätseinheiten Antitoxin intraperitoneal
12. XI.	" 2 "	" " " "
21. XI.	" $\frac{1}{2}$ Maßen "	" " " "
30. XI.	" 1 "	" " " "
10. XII.	" " "	das Tier entblutet.

Bei zwei anderen Tieren stieg ich im Laufe der Immunisierung innerhalb 11 Wochen auf 3 Maßen Agarkulturen, sodaß die Tiere, da jede der Maßenkulturen etwa 12 Schrägagarröhrchen entspricht, innerhalb dieser kurzen Zeit 36 Agarkulturen virulenter Diphtheriebacillen erhalten hatten, ohne daß diese Prozedur auf das Aussehen oder Gewicht der Tiere ungünstig eingewirkt hätte. An der Einstichstelle entwickelt sich öfter ein kleines derbes Infiltrat, weil etwas von der Bacillussuspension in das subkutane Gewebe dringt, was sich nicht stets vermeiden läßt. Selbst dann, als ich zum Immunisieren der Kaninchen einen für Meerschweinchen äußerst wenig pathogenen DB.-Stamm benutzte, entstand bei dem subkutan immunisierten Tier eine große Nekrose, während die zum Vergleich intraperitoneal und intravenös vorbehandelten Tiere gesund blieben. Demnach wird die, im allgemeinen zwar schonende,

1) Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 46.

2) Dtsch. med. Wochenschr. 1902.

3) Die Kulturen werden in Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

kombinierte Immunisierung von Bacillen plus Antitoxin doch vom subkutanen Gewebe schlecht vertragen, so daß ich später die Kaninchen ausschließlich von der Bauchhöhle immunisierte. Schon in der früheren Mitteilung über agglutinierende Wirkung derart gewonnener bakterieller Immunsera war ich auf Schwierigkeiten in der Agglutinationsfrage gestoßen, die dazu geführt hatten, eine Verschiedenheit im Rezeptorenapparat der einzelnen Diphtheriestämme anzunehmen. Bei Weiterführung dieser Versuche bin ich in meiner Annahme noch bestärkt worden. Im ganzen wurden 5 DB.-Stämme verschiedenster Herkunft zum Immunisieren benutzt. In allen diesen Fällen wurde der jeweils zum Immunisieren benutzte Stamm durch das entsprechende Immunserum in einer Verdünnung von 1:1000 kräftig agglutiniert, nachdem die Kaninchen Aufschwemmungen von 1—2 Maßen Agarkulturen erhalten hatten. Sobald ich mich von der Wirksamkeit der Sera überzeugt hatte, prüfte ich den Einfluß jedes dieser Sera auf eine Reihe anderer Diphtheriestämme. Drei von den untersuchten Immunseris agglutinierten andere Stämme spurweise oder überhaupt nicht, wie das in Tabelle I als Beispiel angeführte Serum des mit dem Stamme 4 immunisierten Tieres zeigt:

Tabelle I.

Serumverdünnung	Agglutinationswirkung des Immunserums gegenüber:					
	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3	Stamm 4	Stamm 5	Stamm 6
1: 20	0	0	0	+++	0	+
1: 60	0	0	0	+++	0	0
1: 180	0	0	0	+++	0	0
1: 540	0	0	0	+++	0	0

Anmerkung. +++ bedeutet sehr starke Agglutination
 ++ " " mittel " "
 + " " schwache "

Durchaus anders aber verhielten sich die beiden Stämme No. 1 und No. 2¹⁾. Das gegen den Stamm 1 gerichtete Immunserum agglutinierte auch den Stamm 2 in gleicher Serumverdünnung, und ebenso wirkte das Serum des gegen Stamm 2 immunisierten Tieres auf Stamm 1. Weiter interessant war es, daß beide Immunsera auch anderen Stämmen gegenüber gleiches Verhalten zeigen, wie Tabelle II zeigt.

Tabelle II.

Serumverdünnung	Das gegen Stamm 1 gerichtete Immunserum eingestellt gegen:					Das gegen Stamm 2 gerichtete Immunserum eingestellt gegen:				
	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3	Stamm 4	Stamm 5	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3	Stamm 4	Stamm 5
1: 20	+++	+++	++	0	0	+++	+++	+++	0	0
1: 60	+++	+++	+	0	0	+++	+++	+++	0	0
1: 180	+++	+++	+	0	0	+++	+++	+	0	0
1: 540	+++	+++	0	0	0	+++	+++	0	0	0

1) Die Bezeichnung No. 1 und 2 ist der besseren Uebersicht wegen gewählt; es sind diese beiden Stämme identisch mit den in der ersten Mitteilung als 861 und Henuis bezeichneten Kulturen.

Die beiden Stämme zeigen also eine weitgehende Aehnlichkeit in ihrem Rezeptorenapparat; übereinstimmend damit besteht auch in Säurebildung und Meerschweinchenvirulenz zwischen diesen Stämmen kein deutlicher Unterschied, dagegen scheint in der Länge der Bacillen vielleicht eine kleine Differenz vorhanden zu sein.

Die wiedergegebenen Versuchsergebnisse, die mich dazu führen, eine zum wenigsten quantitative Verschiedenheit im Rezeptorenapparat der einzelnen DB.-Stämme anzunehmen, stehen in einem gewissen Gegensatz zu den Resultaten von Lubowski¹⁾ und von Schwoner²⁾, welche mit einem einzigen Immuserum durchgehends Agglutination sämtlicher Diphtheriestämme erzeugen konnten.

Dieser Widerspruch findet seine Erklärung und ist begründet in der verschiedenartigen Immunisierung. Das Serum, dessen sich Lubowski zu seinen Agglutinationsversuchen bediente, entstammte einer Ziege, die bei der letzten Injektion die gewaltige Menge von 150 Serumplatten einer atoxischen und avirulenten DB.-Kultur erhalten hatte. Trotzdem agglutinierte es Diphtheriebacillen nur in starken Konzentrationen 1:20 und 1:40. Schwoner dagegen benutzte ein polyvalentes Serum von einem Pferd, das er mit 12 verschiedenen Diphtheriestämmen immunisiert hatte. Seine Resultate, die sich prinzipiell mit denen Lubowskis decken, sind ausgezeichnete; das angewandte Immuserum agglutinierte Diphtheriebacillen noch in einer Verdünnung von 1:1000, ließ dagegen Pseudodiphtherie B. unbeeinflusst.

Wir werden uns daher vorstellen müssen, daß der Rezeptorenapparat der Diphtheriebacillen, gewisse bei allen Stämmen wiederzufindende Typen „Grundrezeptoren“, aufweist, die vielleicht in verschiedenen Proportionen auftreten, während jedem einzelnen Stamm „Partialrezeptoren“ eigentümlich sind, welche qualitative Unterschiede gegenüber anderen Partialrezeptoren zeigen. Wenn man daher die Menge der zum Immunisieren benutzten Bacillen bis zu einem gewissen Grade steigern kann, was bei kleinen Versuchstieren wie Kaninchen sehr bald Schwierigkeiten hat, so wird man schließlich ein Serum gewinnen, das genügend Antikörper (Agglutinin) auch gegen die in den kleinsten Proportionen vorhandenen Grundrezeptoren des zum Immunisieren benutzten Stammes enthält. Das so beschaffene Serum wird, wofern die Besetzung der Grundrezeptoren durch Agglutinin zur Auslösung der Agglutination ausreicht, auch diejenigen Bacillen agglutinieren, welche nur in den Grundrezeptoren mit dem zum Immunisieren benutzten Stamm übereinstimmen. Man wird erwarten dürfen, daß in solchen Fällen der Agglutinationstitre niedrig bleibt, wie es in den von Lubowski publizierten Daten deutlich zu Tage tritt. Aussichtsvoller und praktisch brauchbarer erscheint der Weg, den Schwoner eingeschlagen hat, nämlich durch Immunisieren mit einer Reihe von Stämmen ein polyvalentes Serum herzustellen; möglicherweise gelingt es derart, die Differenzierung von Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen durch Agglutination auch praktisch zu verwerten.

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXV. 1900.

2) Wiener kl. Wochenschr. 1902.

Bakterizidie.

Der Gedanke ein Serum zu gewinnen, welches nicht nur das von den Diphtheriebacillen erzeugte Toxin neutralisiert, sondern welches die Bacillenleiber selbst angreift, ist nicht neuen Datums, da ein derartiges bakterizides Serum besonders mit Rücksicht auf eine endgültige Vernichtung der DB. manchen Vorteil verspricht. Versuche in dieser Richtung sind auch schon vielfach angestellt worden. Daß es nicht gelingt, Meer-schweinchen durch Immunisierung mit solchen Diphtheriekulturen, welche ihre Virulenz verloren haben, zu immunisieren, ist schon von C. Frankel¹⁾ konstatiert und stets bestätigt gefunden. Klein²⁾ immunisierte Meer-schweinchen mit lebenden Bacillen von der Bauch-höhle aus, nachdem er gefunden hatte, daß die Tiere intraperitoneal Dosen vertragen, die, subkutan verabreicht, sicher töten. (Auf diese interessante Erscheinung, die auch ich stets beobachtete, komme ich später zurück.) Ein derart immunisiertes Tier — es hatte $\frac{1}{3}$ Gelatine DB.-Kultur erhalten — lieferte ein Serum, von dem 0,25 gegen eine sicher tödliche Dosis schützte. Weil einige Stunden nach der intra-peritonealen Injektion Bacillen im Peritonealexsudat nicht mehr nachzuweisen sind, meint Klein, daß die Bacillen in der Bauchhöhle schnell zerstört werden, und deshalb Toxin nicht sezernieren können, woraus sich die Unmöglichkeit der Antitoxinbildung ergibt. Die theoretische Beweis-führung des Verfassers erscheint nicht zwingend, enthalten doch die Bacillenleiber selbst Toxin, wie Kossel³⁾ Brieger und Boer⁴⁾ sowie Aronson⁵⁾ gezeigt haben. Wir sind deshalb geneigt, da eine Prüfung des Serums auf Antitoxin nicht stattgefunden hat, die Schutzwirkung des Kleinschen Serum doch antitoxischen Eigenschaften zuzuschreiben. Ähnliche Bedenken habe ich auch gegen die Versuche van de Veldes⁶⁾, der mit gewaschenen und so von Toxin möglichst befreiten Diphtherie-bacillen eine Ziege immunisierte, und dies Serum heilkräftig gegen Diphtherieinfektion fand. Zwar hat van de Velde das Immunserum auf Antitoxin geprüft und es in Dosen, die man versucht hat, antitoxin-frei befunden, doch läßt dieser Passus, da Zahlen fehlen, immer noch die Deutung zu, daß geringe Antitoxinmengen im Serum enthalten waren, was nach der Herstellungsart des Serums auch a priori wahr-scheinlich ist.

Einen anderen indirekten Weg zum Nachweis bakterizider Anti-körper eines Immunserums benutzte Lambotte⁷⁾ welcher das Verfahren Bordets zum Nachweis der substance sensibilisatrice (Ambozeptor) anwandte; es beruht dies bekanntlich darauf, daß sensibilisierte, id est mit Ambozeptor beladene Bacillen, dem Serum sämtliches Komplement entreißen. Lambotte fand, daß das gewöhnliche antitoxische Serum einen Einfluß auf Diphtheriebacillen im genannten Sinne nicht hat, da-gegen fiel der Bordetsche Versuch mit dem Serum von Meer-schweinchen, welche er gegen Diphtheriebacillen immunisiert hatte, positiv aus. Im Tierexperiment hat Lambotte die Wirksamkeit dieses Serums nicht geprüft. Welch geringer Wert aber der Bordetschen

- 1) Berl. klin. Wochenschr. 1890. No. 49.
- 2) Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. XX.
- 3) Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXVII. Heft I.
- 4) Deutsche med. Wochenschr. 1896. No. 49.
- 5) Archiv f. Kinderheilkunde. Bd. XXX.
- 6) Centralbl. f. Bakteriologie. 1897. No. 22.
- 7) Ebenda. Bd. XXX. p. 817.

Methode als Prüfstein eines bakteriziden Immunserums in praxi zugemessen werden darf, geht schon daraus hervor, daß es dem Verfasser mit einem gegen Pseudodiphtheriebacillen gerichteten Serum gelang, auch echte Diphtheriebacillen, freilich schwächer, zu sensibilisieren.

An dieser Stelle möge auch das vorher erwähnte präzipitierende Serum von Wassermann genannt sein, von dem aber Tierversuche nicht berichtet werden.

Endlich ist kürzlich von Bandi¹⁾ eine ausführliche Mitteilung über ein gegen Diphtheriebacillen gerichtetes Immunserum erschienen, das im Tierversuch wie Krankenbett gleich gut wirken soll. Wenn aber dieser Autor schreibt:

„Die Kontrollversuche, die bei den Versuchstieren mit diesem Serum und einigen Handelsseris nämlich dem vom Institut Pasteur, dem vom Institut für Serumtherapie in Brüssel, dem vom Institut für Serumtherapie in Bern ausgeführt wurden, ergaben stets das gleiche Resultat, daß nämlich diese Sera eine sehr geringe Wirkung haben; es gelang niemals mit diesem Tiere zu retten, denen tödliche Dosen des Versuchsbacillus eingepft worden waren, ihre Wirkung beschränkte sich vielmehr darauf, den Infektionsprozeß zu verzögern, wenn man sie in großen Mengen anwandte“,

muß man schließen, daß der Versuchsbacillus nie und nimmer ein Diphtheriebacillus ist, denn in der heilkräftigen Wirkung des Antitoxins gegenüber Diphtherieinfektionen im Tierexperiment stimmen heute alle Autoren überein; demnach ist auch das Serum, welches Bandis Bacillus beeinflusst, kein Diphtherieimmunserum.

Der Nachweis diphtherizider Eigenschaften eines Immunserums ist, wie aus den zitierten Arbeiten hervorgeht, bislang nicht geglückt, denn in den dafür sprechenden Tierexperimenten (Klein, van de Velde) war eine antitoxische Wirkung nicht sicher ausgeschlossen. Für die Herstellung eines bakteriziden Immunserums kamen zwei Momente in Betracht, einmal galt es, dem zu immunisierenden Tier möglichst große Mengen Bacillen einzuspritzen, ferner aber war die Antitoxinproduktion zu unterdrücken, weil das Antitoxin die Beurteilung bakterizider Heilwirkung erschwert. Beide Anforderungen werden durch das eingangs beschriebene Immunisierungsverfahren erfüllt; es war bereits nachgewiesen, daß dabei spezifische gegen die infizierten Bacillenleiber gerichtete Antikörper, nämlich Agglutinine, entstehen.

Bei der Prüfung auf Diphtherieantitoxin zeigten alle Tiere, welche nur intraperitoneal mit DB.-Kultur plus Antitoxin vorbehandelt waren, und deren Serum bis auf $\frac{1}{20}$ und $\frac{1}{30}$ Immunitätseinheit geprüft wurde, kein Antitoxin. Demnach ist das von den Bacillen produzierte oder in ihnen enthaltene Toxin von dem beigegeführten Antitoxin vollkommen neutralisiert, da einerseits jede Giftwirkung und andererseits Antitoxinbildung ausgeblieben ist. Dagegen enthielt das Serum der Kaninchen, welche am Schluß der Immunisierung außer der intraperitonealen Injektion einer Aufschwemmung von 2 Maßen Agarkulturen DB. plus 400 Immunitätseinheiten Antitoxin noch je eine Aufschwemmung eines Schrägagarröhrchens derselben Kultur plus 200 Immunitätseinheiten Antitoxin intravenös erhalten hatten, nach 14 Tagen reichlich Antitoxin. Es liegt nahe, dabei an eine passive Immunisierung zu denken. Ein derartiges Serum kann man trotzdem auf bakterizide Funktion prüfen, nur muß man den Antitoxintitre einigermaßen kennen, um ihn bei Heilerfolgen mit in Rechnung zu setzen.

Die zu den Versuchen benutzte Kultur No. 3 tötet bei subkutaner

1) Centralbl. f. Bakteriologie. Bd. XXXII. No. 7.

Impfung von $\frac{1}{40}$ Oese Meerschweinchen von 250 g Gewicht sicher in 4 Tagen, während die mit $\frac{1}{80}$ Oese gespritzten Tiere erst in der zweiten oder dritten Woche sterben, auch wohl manchmal durchkommen. Die als Einheitsmenge bei subkutaner Infektion verwandte Dosis von $\frac{1}{8}$ Oese entspricht also 5—10 tödlichen Dosen, zu deren Neutralisierung man $4\frac{1}{10}$ — $8\frac{1}{10}$ Immunitätseinheiten Antitoxin bedarf. Bei intraperitonealer Infektion braucht man zur Tötung der Tiere $\frac{1}{10}$ Oese, also das 4—8-fache Multiplum der dosis letalis subcutanea. Dieser Unterschied beruht nicht auf bakteriziden Fähigkeiten der freien Peritonealflüssigkeit, welche von mir in vitro wie im Tierversuch als ganz unwirksam befunden wurde.

Auf Grund der bei den Agglutinationsversuchen gewonnenen Ueberzeugung, daß die einzelnen Diphtheriestämme bedeutende Unterschiede im Rezeptorenapparat aufweisen, benutzte ich zu bakteriziden Versuchen ausschließlich das Serum solcher Kaninchen, welche gegen den Versuchsbacillus immunisiert waren. Dieses Immunserum agglutinierte den Versuchsbacillus noch in einer Verdünnung 1:1000, ließ aber in vitro trotz verschiedenartigster Versuchsanordnung keine bakterizide Eigenschaft erkennen.

Kaninchen A.

Das Tier erhielt am 30. XI. 1902 1 Maßen Agarkultur Aufschwemmung DB. No. 3 + 400 Immunitätseinheiten Antitoxin intraperitoneal, und wird am 10. XII. 1902 entblutet. Das antitoxinfreie, stark agglutinierende Serum wird auf bakterizide Wirkung derart untersucht, daß eine Reihe Meerschweinchen abfallende Mengen Serum intraperitoneal erhalten und 6 Stunden darauf eine mehrfach tödliche Dosis DB.-Kultur subkutan, (s. Tabelle III) während eine zweite Reihe Meerschweinchen die entsprechenden Mengen Kultur und Serum zusammen subkutan erhielt. S. Tabelle IV.

Tabelle III.

Menge des injizierten Immunserums	Menge der injizierten Diphtheriekultur	Ausfall des Tierversuchs
1,0 ccm	$\frac{1}{8}$ Oese	+ ₂
0,3 „	$\frac{1}{8}$ „	+ ₂
0,1 „	$\frac{1}{8}$ „	+ ₂
— „	$\frac{1}{8}$ „	+ ₂

Serum intraperitoneal. Nach 6 Stunden Kultur subkutan.

Tabelle IV.

Menge des injizierten Immunserums	Menge der injizierten Diphtheriekultur	Ausfall des Tierversuchs
1,0 ccm	$\frac{1}{8}$ Oese	+ ₂
0,3 „	$\frac{1}{8}$ „	+ ₂
0,1 „	$\frac{1}{8}$ „	+ ₂
— „	$\frac{1}{8}$ „	+ ₂

Kultur + Serum subkutan gleichzeitig.

Der Mißerfolg in beiden Serien ist der gleiche, selbst die mit 1,0 ccm Immunserum gespritzten Tiere überlebten die Kontrolltiere nicht. Hatte ich mich derart von der völligen Unwirksamkeit meines agglutinationskräftigen Serums überzeugt, da es die Diphtherieinfektion in keiner Weise beeinflussen konnte, so galt es noch zu versuchen, ob dieses Serum an sich wirkungslos, nicht doch in Verbindung mit Antitoxin im Kampfe gegen die Diphtherieinfektion nützlich sein konnte. Es war möglich, daß in der beschriebenen Versuchsanordnung die bakterizide Wirkung deshalb nicht zur Geltung gekommen war, weil die Tiere der Toxinwirkung zu schnell erlagen. Die Versuchsanordnung mußte demnach so sein, daß ich dieses Immunserum mit Antitoxin versetzte und gegen den Versuchsbacillus einstellte. Da einige der immunisierten Kaninchen,

wie vorhin erwähnt, Antitoxin im Blut enthielten, wurde deren Serum zu folgenden Versuchen benutzt.

Kaninchen B.

Das Tier erhielt am 20. XII. 1902 als letzte Injektion die Aufschwemmung von 2 Maßen Agarkulturen DB. No. 3 plus 400 Immunitätseinheiten Antitoxin intraperitoneal und die von einem Schrägagarröhrchen plus 200 Immunitätseinheiten intravenös. Das Tier wird am 5. I. 1903 getötet und ein Antitoxingehalt von etwa 1 Immunitätseinheit pro ccm Serum nachgewiesen. Tabelle V ergibt die Serumwirkung bei gleichzeitiger subkutaner Injektion von Serum plus Kultur.

Tabelle V.

Injizierte Kulturmenge	Menge des injizierten Kaninchenimmunserums	Ausfall des Tierversuchs
$\frac{1}{8}$ Oese	0,5 ccm	davon
$\frac{1}{8}$ "	0,1 "	+ ₃
$\frac{1}{8}$ "	0,02 "	+ ₃
$\frac{1}{8}$ "	0,004 "	+ ₂
$\frac{1}{8}$ "	—	+ ₂

In diesen Versuchen kamen also die Tiere mit dem Leben davon, welche mit 0,5 ccm Immunserum gespritzt waren, dessen antitoxischer Wert etwa $\frac{1}{2}$ Immunitätseinheit, wie vorhin ermittelt, entspricht. Da aber, wie bereits erwähnt, die gleiche Wirkung von $\frac{4}{1,0}$ — $\frac{8}{1,0}$ Immunitätseinheiten eines rein antitoxischen Serums erzielt wird, so entspricht die Schutzkraft des Kaninchenimmunserums lediglich dem in ihm enthaltenen Antitoxin.

In einer anderen Versuchsreihe injizierte ich Meerschweinchen aus anderen Gründen Kultur und Serum intraperitoneal. In einer anderen Reihe Rubrik 3 ist als Kontrolle ein rein antitoxisches Serum eingestellt.

Tabelle VI.

Injizierte Kulturmenge	Menge des injizierten Kaninchenimmunserums	Menge des antitoxischen Serums in Immunitätseinheiten ausgedrückt	Ausfall des Tierversuchs
$\frac{1}{4}$ Oese	0,5 ccm	—	davon
$\frac{1}{4}$ "	0,1 "	—	davon
$\frac{1}{4}$ "	0,02 "	—	+ ₁₁
$\frac{1}{4}$ "	0,004 "	—	+ ₇
$\frac{1}{4}$ "	0,0008 "	—	+ ₈
$\frac{1}{4}$ "	—	2,4 I. E.	davon
$\frac{1}{4}$ "	—	0,48 I. E.	davon
$\frac{1}{4}$ "	—	0,096 I. E.	davon
$\frac{1}{4}$ "	—	0,0192 I. E.	+ ₇
$\frac{1}{8}$ "	—	—	+ ₁₀

$\frac{1}{4}$ Oese + 0,5 ccm Kaninchen-Normalserum +

In dieser Reihe kamen die Tiere mit dem Leben davon, welche 0,1 des agglutinierenden Immunserums, sowie die, welche 0,1 (0,096) Immunitätseinheit Antitoxin erhalten hatten, so daß auch in diesem Falle der Heilwert des Kaninchenimmunserums seinem antitoxischen Wert entspricht, wenn man demselben den Gehalt von 1 I.E. in 1 ccm zu Grunde legt. Auf Grund dieser und ähnlicher Versuche mußte von

der Annahme einer bakteriziden Quote im Kaninchenimmenserum Abstand genommen werden. Das Versagen jeder Schutzwirkung dürfte ich nicht ohne weiteres auf den absoluten Mangel an bakteriziden Ambozeptor beziehen, vielmehr mußte noch eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß nämlich im Kaninchenimmenserum ein bakterizider Ambozeptor vorhanden ist, der im Meerschweinchenorganismus kein passendes Komplement findet. Aehnliche Beobachtungen sind von Sobernheim im Milzbrandversuch und von Wechsberg¹⁾ im Taubenexperiment mit *Vibrio Metschnikoff* gemacht worden. Zur Entscheidung dieser Frage immunisierte ich Meerschweinchen auf die vorhin beschriebene Art von der Bauchhöhle aus. Das antitoxinfrei befundene Serum erwies sich als gänzlich unwirksam. Nicht so gleichmäßige Resultate ergab die künstliche Infizierung der aktiv immunsierten Tiere, da bei einer nicht sehr hoch gegriffenen Dosis letalis die Tiere zuweilen am Leben blieben. Dieses Resultat war aber viel zu unregelmäßig, als daß es im Sinne der vorhin gegebenen Erklärung sprechen könnte. Jedenfalls sprechen die durchaus negativen Resultate, bei den Versuchen mit einem derartigen Serum zu schützen, dafür, daß ein bakterizid wirksamer Ambozeptor bei der Immunisierung mit lebenden Diphtheriebacillen nicht entsteht.

Was aber für Kaninchen und Meerschweinchen gilt, ist nicht ohne weiteres zu verallgemeinern, und der Versuch an größeren Tieren, wie Pferden, eine derartige kombinierte Immunisierung vorzunehmen scheint trotzdem gerechtfertigt. Daß die Pferde diese Immunisierung, wenn man von subkutaner Impfung absieht, und etwa intravenös injiziert, gut vertragen werden, ist nach den bei so Diphtherie-empfindlichen Tieren wie Kaninchen und Meerschweinchen gemachten Erfahrungen durchaus wahrscheinlich. Es hätte die Verwendung großer Tiere den Vorteil, daß man bedeutend größere Mengen von Bacillen einspritzen könnte, als es bei kleinen Versuchstieren möglich ist, auch könnte man mit Leichtigkeit nach dem Vorgehen von Schwoner polyvalent immunisieren, eine Methode welche mir mit Rücksicht auf die gefundene Verschiedenheit der Rezeptoren der Diphtheriebacillen besonders angezeigt zu sein scheint.

Herrn Professor M. Neisser sei an dieser Stelle für die freundliche Unterstützung der herzlichste Dank ausgesprochen.

Nachdruck verboten.

Deutungsversuch der Eigenschaften und Wirkungsweise der Immunkörper.

Von Prof. Dr. H. Zangger, Zürich.

In dieser Arbeit möchte ich die Entstehungs- und Wirkungsweise der Reaktionskörper des animalen Organismus von einem Gesichtspunkte aus betrachten, der von dem allgemein acceptierten abweicht. Wenn Ehrlich in seiner Seitenkettentheorie alles in Parallele setzt mit der Chemie der Konstitutionsformeln, so möchte ich hier nachweisen, daß

1) Zur Lehre von der natürlichen Immunität und über bakterizide Heilsera. (Zeitschr. f. Hygiene und Infektion. Bd. XXX.)

viele der heute bekannten Eigenschaften sich besser physikalisch deuten lassen. Die Antikörper sind nicht rein dargestellt und keine Atomgruppe ist festgestellt; ihre Existenz ist nur aus ihren Wirkungen erschlossen — sie zeigen überhaupt nur unter bestimmten Bedingungen der Lösung ihre charakterisierenden Eigenschaften.

Gehen wir die einzelnen Klassen durch nach allen wichtigen Eigenschaften, die wir von ihnen kennen: Einleitend die Toxine; dazu gehören sicher chemisch die verschiedensten Individuen; einheitlich ist allen, daß sie in bestimmten Tierkörpern Krankheitserscheinungen hervorbringen und in bestimmten Dosen Fieber, und daß der Körper durch Produktion von diese bindenden Gegenkörpern reagiert.

Chemisch sind sie meist basisch; einzelne sollen als Salze dargestellt und kristallisiert werden können¹⁾. Die meisten aber sind nicht kristallinisch dargestellt; sie filtrieren gut, aber dialysieren meist schlecht oder gar nicht, verteilen sich aber im Tierkörper leicht. Höhere Temperaturen nehmen ihnen die Giftigkeit, aber sie ertragen im Allgemeinen höhere Temperaturen besser als die Antikörper. Einzelne Gifte werden auch durch Lösungsmittel in weniger oder gar nicht giftige Modifikationen übergeführt, die aber doch Antikörper erzeugen (Tetanugift durch Schwefelkohlenstoff). Sie binden sich unter bestimmten Verhältnissen mit den Antikörpern scheinbar nach den Gesetzen der Chemie; aber wenn a Antitoxine b Toxine neutralisieren, so neutralisieren 100 a Antitoxine z. B. nicht 100 b Toxine, sondern 101—110 ja 150 und mehr, also die Bindung erfolgt nicht nach dem Gesetz der multiplen Proportion.

Die Toxine reagieren im ganzen langsam im Vergleich zu den neuesten chemischen Reaktionen.

Im Tierkörper, bei 37°, dauert es mindestens mehrere Stunden, bis z. B. Fieber erscheint, oft Tage (Inkubation). (Schnell wirken im Tierkörper Schlangengift und Aalgift, aber im Reagenzglase braucht z. B. Schlangengift mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde zur Neutralisation.)

Am auffallendsten ist wohl aber die Tatsache, daß im tierischen Organismus eine Einheit Toxin bis 100000 diese Einheit neutralisierende Antitoxinmengen zu erzeugen vermag, und ferner, daß die Antitoxinmenge lange Zeit im Blute des Tieres nicht sinkt, wenn man ihm auch Serum und damit Antitoxine entzieht. (Auch ohne Entzug schwankt der Gehalt sehr oft stark in kurzer Zeit und verschwindet mit der Zeit spontan.)

Einzelne Toxine zeigen spezifische Absorptionseigenschaften, z. B. die Gifte des Bacillus der Wurstvergiftung, werden absorbiert und ungiftig gemacht durch Cholesterin, Lecithin, Tyrosin, viele andere durch leukocytenhaltige Flüssigkeiten.

Auch andere poröse oder quellbare Körper absorbieren Toxine, so daß deren Gemisch im Tierkörper die Giftigkeit verliert. So absorbiert frisches Karminpulver das Tetanustoxin; erhitzt man aber vorher das Karmin, so verliert es diese Eigenschaft (Stoudensky).

Der spezifische Immunkörper (Ambozeptor) charakterisiert dadurch, daß er sich auf bestimmte Zellen zuerst festsetzt wie eine Beize und diese vorbereitet für die lösende Alexinwirkung, ist weniger beständig als die Toxine; bei längerem Erwärmen auf 70° verliert er seine Eigenschaften, einzelne schon bei niederen Temperaturen. Er

1) Tetanus, z. B. Behring, Brieger, Boer; Phthisis: Schroen.

filtriert weniger gut als die Toxine, dialysiert fast gar nicht; auf andere Weise als durch Zellen, die ihn absorbieren, ist er unzerstört nicht faßbar; auch mit den Komplementen geht er in der Lösung im allgemeinen keine Verbindung ein. Er verschwindet spontan aus dem Serum, ohne daß gleichzeitig die Immunität zu schwinden braucht. Meist dauert die Immunität bedeutend länger, als sich Immunkörper im Serum nachweisen lassen.

Im Blutplasma, wie es im immunisierten Tiere zirkuliert, ist er nicht vorhanden oder spärlich; erst durch das Stehen- und Gerinnenlassen des Blutes wird er frei, und zwar quantitativ entsprechend den im Blute vorhandenen weißen Blutkörperchen.

Nachzuweisen ist er im Blutserum, im Peritoneum und in längere Zeit bestehenden Oedemen und Exsudaten der immunisierten Tiere, nicht in der Augenkammer, nicht in Milch und Urin.

Er ist veränderlich, geht spontan in inaktive Zustände über, und zwar um so schneller, je verdünnter er ist.

Die Alexine, die typischen zelllösenden Fermente sind weniger spezifiziert, resp. weniger zahlreich als die Beizen; es lassen sich bis jetzt wohl mehrere Formen unterscheiden nach den Reaktionen; physikalisch getrennt sind bis jetzt zwei (durch Filtration), die auch verschiedene Wirkung haben.

Sie filtrieren sehr schlecht, resp. nicht, sind im animalen Körper nur im Blute, Knochenmark, Lymphdrüsen und eventuell im Peritoneum zu finden, im allgemeinen nicht im Exsudat und Oedem, nie im Kammerwasser, Milch, Urin.

Sie verändern sich spontan sehr leicht; in ganz kurzer Zeit in einer fremden Tierart, verlieren (verändern) ihre Eigenschaften nach Salzzug, bekommen sie aber unter Umständen (nach London) wieder in den ursprünglichen Verhältnissen.

Sehr viele Zusätze, speziell Zellen, z. B. Hefe, aber auch feine Pulver reißen die Alexine mit nieder. Es existiert keine Methode, die Alexine außerhalb des Tierkörpers, in dem sie entstanden, längere Zeit aufzubewahren.

Die Alexine sind also die temperaturempfindlichsten (56°), schwerst diffundierenden, am leichtesten fällbaren, veränderlichsten Körper der Antikörperreihe.

Vorläufig mehr diagnostisch wichtig sind die

Agglutinine für die Bakterien species einzelner Infektionen, resp. der Fiebererregung und die

Präzipitine für spezifische Eiweißkörper, speziell des Blutes.

Beide Körper sind ungefähr temperaturempfindlich wie der spezifische Immunkörper. Aus dem Kollodiumsack dialysieren sie nicht; sie wirken nur bei bestimmtem Salzgehalt md. Reaktion der Lösung — ohne Salze wirken die Präzipitine gar nicht (Bordet).

Auffallend ist, daß Fälle bekannt werden, in denen das Agglutinin intensiver wirkt nach Erwärmen auf 60° ; nach Erwärmen über 70° verliert es endgiltig jede Wirkung. Die Präzipitine lassen sich durch Salze aus den Lösungen fällen, gehen dann aber sehr schnell zu Grunde. Vollständig getrocknet sollen die Agglutinine und Präzipitine analog den Antitoxinen konservierbar sein. Aber beide Körper sind spezifisch und haben wohl nichts mit einander zu tun, trotz vieler analoger Eigenschaften auch mit dem Immunkörper.

Nun noch eine Reihe von Tatsachen, die nur physikalisch erklärt werden können oder die heute mindestens physikalisch leichter erklärt werden können als chemisch, und die allen Körpern mehr oder weniger gemeinsam sind.

Die Bindung von Toxin-Antitoxin ist konstant, aber folgt nicht dem Gesetze der chemischen Proportion. Buchner beobachtete, daß eine kleine Menge erwärmtes hämolytisches Serum nicht eine der hämolytischen Serummenge proportionale Menge Blutkörperchen löst, sondern daß diese Menge sehr weitgehend abhängig ist von dem Zusatz, resp. der Menge des normalen, nur Komplemente haltenden Serums. Unter anderen Kombinationen nehmen die Hälfte der sonst lösbaren Blutkörperchen alle Immunkörper aus dem hämolytischen Immunserum weg.

Nur gezwungen kann ferner chemisch die Tatsache erklärt werden, daß zuerst der Immunkörper wie eine Beize auf den Zellen sich fixieren muß, bevor sich das Komplement mit ihr verbindet. Ebenso, daß ein Gemisch von aktivem und inaktiviertem Menschenserum Kaninchenblutkörperchen nicht auflöst, während das normale Blutsrum ohne Zusatz aktiv löst. (Hierher gehört die große Reihe Tatsachen über Wirkungshemmungen der neuesten Untersuchungen.)

Alle diese Reaktionskörper verlieren ihre Eigenschaften bei einer Temperatur von 50—80°, die Toxine oft erst über 100° (sehr variabel). Alle haben die Tendenz, unter allen Bedingungen in weniger aktive Modifikationen überzugehen; von einzelnen ist bekannt, daß sie nur unter bestimmter Salzkonzentration und unter bestimmter Reaktion wirken, daß sie durch Salzwirkungen sogar zerstört werden können.

Von den weniger labilen Toxinen weiß man, daß sie in trockenem Zustande bei Luft- und Lichtabschluß einige Zeit aufbewahrbar sind, während sie in gequollenem oder gelöstem verdünntem Zustande sehr schnell ihre typischen Eigenschaften verlieren. (Die Toxine sind auch auf ihre Beeinflussbarkeit durch Elektrizität untersucht; sie gehen durch starke Entladungen in ungiftige Modifikationen über.) Alle diese Stoffe dialysieren sehr schwer oder gar nicht und kristallisieren nicht (die kristallisierten Produkte scheinen durch diese Prozedur den Hauptteil ihrer biologischen Eigenschaften zu verlieren). Die Reaktion ist im Allgemeinen sehr langsam, bedeutend langsamer als die Reaktionen der meisten Körper der organischen Chemie; ferner muß physikalisch erklärt werden die ungleiche Verteilung in den tierischen Organen, auch wenn die Körper aus den Zellen, in denen sie entstanden, frei geworden.

Verteilung der einzelnen Immunkörper im tierischen Organismus.

	Knochenmark Blut	Peritoneum	Oedem	Exsudat	Augenkammer	Milch	Urin	Fötus	Ei
Alexine	+	+	selten	selten	—	—	—	?	?
Amboceptor (Beize)	+	+	+	+	—	—?	—	?	?
Agglutinine	+	+	+	+	selten	+	+	+	?
Antitoxine	+	+	+	+	+ wenig	+	+	+	+ (Huhn)
Toxine	+	+	+	+	+	+	+	+	+

An m. Die Toxine kommen überall hin, werden aber von einzelnen Organen mehr absorbiert, z. B. Tetanustoxin durch Gehirn und Genitaldrüsen.

Diese Tatsachen sind für die Methoden der Gewinnung der Antikörper einerseits wichtig, andererseits aber vor allem für die Vorstellung lokalisierter Wirkungsweisen im animalen Organismus. Hierher gehören auch die biologischen Phänomene der Agglutination, die Präzipitation und die lytische Wirkung der Immunsereen, resp. das Zusammenwirken von zwei Körpern, von denen der eine zuerst als Beize wirken muß, und somit gehört hierher auch die Reaktivierung der durch Hitze inaktivierten Seren, ebenso die neueste Entdeckung von Ehrlich und Sachs, daß durch Erhitzen auf 60° inaktiviertes Schlangengift durch Lecithin wieder giftig gemacht werden kann.

Vor allem aber gehört hierher die diese Körper zusammen charakterisierende Eigenschaft, im animalen Organismus ihre Wirkung aufhebende Gegenkörper zu erzeugen, die sich mit diesen teils zu weniger löslichen, immer aber weniger aktiven Verbindungen verbinden. Parallel dieser Eigenschaft geht die Absorbierbarkeit dieser Körper durch Zellen und Zellprodukte, wie auch durch andere Substanzen.

Zellen absorbieren oft elektiv und spezifisch; einzelne Versuche deuten darauf hin, daß auch nicht organisierte Substanzen elektiv spezifisch zu absorbieren vermögen. Daß diese Eigenschaft für die Darstellungsmethoden fundamental wichtig werden kann, ist klar.

Wenn wir alle diese Tatsachen überblicken, so fällt auf, daß es fast nur physikalisch anfaßbare Tatsachen sind, die eine sehr große Analogie haben zu allen typischen Eigenschaften der Fermente, und zwar haben die Fermente und die Antikörper eine große Reihe von Eigenschaften gemein, die einer bis heute von der Chemie stark vernachlässigten Klasse angehören, den Kolloiden. An bekannten Kolloideigenschaften haben diese gemein, daß sie nicht kristallisieren, schwer oder gar nicht dialysieren, daß sie sich gegenseitig in der Lösung beeinflussen, daß sie unter allen Bedingungen die Tendenz haben, in stabileren Formen überzugehen, und zwar besonders in gequollenen und verdünnten Zustand und parallel der Temperatur (unter 100°), daß ihre typischen Eigenschaften sich nur zeigen in bestimmten Kombinationen mit Elektrolyten.

Antikörper und Fermente sind also in Bezug auf ihre Kolloideigenschaften Doppelgänger, und zwar bis ins einzelne, bis in die Größenordnung in Bezug auf Reaktionsgeschwindigkeit, relative Spezifität, und beide sind als typische Kolloide durch einen nur sehr kurz wirkenden intensiven Einfluß weniger alterierbar als durch Dauerwirkungen viel schwächerer Einflüsse.

Um die nahe Verwandtschaft der Vorgänge, wenn nicht Identität, an Tatsachen klar zu machen, will ich noch die Parallelen feststellen zwischen Antikörpern und einzelnen gut untersuchten Fermenten, speziell Lab.

1) Fermente, wie alle Antikörper, verändern sich spontan parallel der Temperatur, aber verschieden schnell, je nachdem sie dargestellt wurden, und vor allem schneller in stärkeren Verdünnungen, bei Mangel an verwandten Kolloiden, bei stärkerem Salzgehalt der Lösung (und zwar beide bei Temperaturen von 50—80° (—100°), beide sind sauerstoffempfindlich.

2) Sind alle nur unter großen Verlusten filtrierbar. Lab dialysiert gar nicht (Fuld); die Antikörper nach den Befunden über Verteilung im animalen Körper filtrieren verschieden, sie dialysieren meist nicht.

3) Lab und Antikörper werden sehr leicht niedergerissen und ausgefällt, z. B. durch Eiweißsubstanzen¹⁾.

4) Eine auch für Kolloide charakteristische Eigenschaft ist ihre Absorptionsfähigkeit, und zwar sind Versuche da, die für eine spezifische Absorption für das Lab sprechen, ohne chemische Beeinflussung. Spezifische Absorption charakterisiert speziell die Antikörper in Bezug auf Zellen, eine Eigenschaft, die weiter zur Reindarstellung von Bedeutung werden kann.

5) Lab wie Toxine und Antikörper erzeugen im animalen Organismus sie bindende Gegenkörper, und zwar spezifischer Art.

6) Die Reaktionen erfolgen aber erst nach längerer Zeit; sie haben also in Bezug auf die physiologische Wirkung eine Inkubationszeit.

7) Sie wirken nur innerhalb enger Temperaturgrenzen.

8) Die auffälligste aller Eigenschaften ist, daß sie nach einzelnen Formen der Schädigung, die ihre Wirkung vollständig aufhob, sich wieder erholen können. Diese Art elektiver Empfindlichkeit wurde für anorganische Fermente von Bredig festgestellt, für Zymase von Buchner.

In Parallele damit stehen die Schädigungen der Antikörper durch bestimmte Salze etc. und deren langsame Erholungsfähigkeit (nach London) in den ursprünglichen Verhältnissen²⁾.

Aus diesen sich fast aufdrängenden Parallelen lassen sich nun eine ganze Reihe für die klinische Medizin wichtige Konsequenzen ziehen:

1) Für die Behandlung der Seren in der Praxis. Die Erkenntnis, daß die wirksamen Körper alle die Eigenschaften von Kolloiden haben, und daß ihre Veränderlichkeit durchaus parallel geht den kolloiden Eigenschaften, daß ihre Existenzbedingungen diejenigen der Kolloide sind, macht mit einem Male verständlich, warum die Seren empfindlich sind gegen erhöhte Temperatur, Licht, Sauerstoff; warum sie nicht lange aufbewahrt werden können in stark verdünntem Zustand; warum sie vor Elektrolytwirkungen und veränderter Reaktion geschützt sein müssen; warum langes Schütteln in großer Verdünnung sie verändern kann, wie ich beobachtete; warum sie subkutan und intravenös, nicht per os gereicht werden dürfen.

2a) Für die Darstellungs- und vor allem für Isoliermethoden sind wichtige Anhaltspunkte vorhanden.

Die Methodik wird sich behelfen müssen mit rein physikalischen Mitteln, vor allem der Dialyse der spezifischen Bindung und der Möglichkeit rein physikalischer Absorption.

Vermieden werden müssen: höhere Temperaturen, chemische Mittel, wie Säuren und Basen; auch die Ausfällungen schädigen, Kristallisation ebenfalls.

1) Das Lab wird aber nach und nach wieder aus den Niederschlägen gereinigt frei, eine Eigenschaft, die event. bei Antikörpern von hoher Bedeutung wäre für die Darstellung. Alkoholniederschläge sind bei den Antikörpern weniger untersucht (Tuberkulin Koch, Nitta, Cytase Levaditi).

2) Eine merkwürdige Parallele ist noch zu erwähnen: das Trypsin wirkt nämlich auf Fibrin 13mal schneller ein, wenn man vorher das morphologische, nichts verändernde Darmferment (Enterokinase) sich auf dem Fibrin fixieren läßt, also ein identisches Verhalten wie die Beize zum Alexin.

Nicht unerwähnt möchte ich einige Beobachtungen lassen, die für klärende Versuche bedeutsame Fingerzeige zu sein scheinen: daß es nämlich gelingt, gegen kolloides Arsensulfid (Lindner, Picton) einen Antikörper zu erzeugen, aber auch andere Arsenverbindungen (Besredka) und ferner gegen einzelne Nitrile (Heymans und Masoin).

Diese Gesichtspunkte müssen nicht nur bei den Seren beachtet werden, sondern vor allem auch bei der Darstellung der Produkte, die zur Immunisierung verwendet werden. So wird z. B. Abtötung der Bakterien durch Hitze, durch chemische Mittel nicht vorgenommen werden dürfen, sondern wenn möglich mechanisch. Deshalb verspricht die Darstellung der Immunisierungsprodukte nach Mac Fadayan, die vor kurzem in der Royal Society in London von Lister warm befürwortet wurde, neue Fortschritte, wenn die Methode zuverlässig, denn er will die gefrorenen, also nicht plastischen und leicht ausweichenden Bakterien mechanisch sicher zertrümmern können. Da die Kälte Kolloide nicht verändert, werden diese Bakterienbreie alles unverändert enthalten, gegen was man Gegenkörper wünscht (auf der anderen Seite ist eine Methode, die auf isolierten, chemisch reinen Giftprodukten zu stehen vorgibt, wie die von Maragliano, an sich ein Fehlgriff).

Da die Antikörper durch veränderte Reaktion geschädigt, durch andere Kolloide absorbiert werden können, so ist eine Darreichung per os wohl immer problematisch, vor allem abhängig von dem Magen und Darminhalt.

b) Aus diesen Eigenschaften der Antikörper lassen sich auch die Erfolge und Mißerfolge der Immunisierung durch direktes Einspritzen der Immunkörper, also die sog. passive Immunisierung, im Gegensatz zu der natürlichen Immunisation durch Ueberstehung einer leichten Erkrankung der spez. Art, erklären.

Zwei Haupttypen existieren: die antitoxische speziell bei Diphtherie und Tetanus und eventuell Schlangengift und die antibakterielle Immunisierung.

Von dieser passiven Immunisierung hatte nur die antitoxische praktischen Erfolg, die Diphtherietherapie; sehr wenig die Tetanustherapie.

Was kann das erklären? Einmal sind die Antitoxine relativ beständig auch im Blute anderer Tierarten; ferner verteilen sie sich überall hin im Körper, und die Affinitäten sind ziemlich ausgesprochen, so daß die Verbindung relativ rasch vor sich geht. Daß aber, nachdem die Toxine bereits in tödlicher Dosis in den Zellen verankert, durch das sich doch langsam verteilende, langsam reagierende Antitoxin noch herausgenommen und neutralisiert würden, ist an sich unwahrscheinlich; jedoch kann alles freie, noch weiter Schädigende gebunden werden. (Bei Tetanus beweisen das vor allem die Erfolge der Präventivimpfung der Pariser Pferde.)

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei passiven, antibakteriellen Serumimpfungen, weil einmal zwei Körper von ganz verschiedenen physikalischen Eigenschaften verwandt werden, wie die Tabelle zeigt, von denen der eine so wie so sehr schnell sich verändert.

Nehmen wir die Tabelle über Verteilung im Körper, so finden wir, daß eingespritzte Immunkörper und Alexine sich ungleich verteilen, daß Alexine meist in Oedem und Exsudaten, wo die Bakterien meist liegen, gar nicht nachzuweisen sind, und auch der Immunkörper geht nur langsam in diese krankhaften, in der Zirkulation jeder Art gestörten Bezirke.

Wenn auch der Antikörper langsam an die Stelle kommen kann, so kommt fremdes Alexin sicher nicht hin; das heißt also, die Bakterien wachsen unbeschädigt weiter, wenn nicht dort vom kranken Körper an Ort und Stelle Alexin gebildet wird. Denn auch das vom kranken Tier produzierte Alexin diffundiert nicht; also kann nur lokal entstandenes,

resp. durch Zellen herbeigebrachtes, also leukocytogenes Alexin wirken. Das ist vielleicht ein Hauptgrund, warum die Krankheitsformen meist progressiv schlimm verlaufen, wenn keine Leukocyten auftreten, also bei sog. negativer Chemotaxis. Aber auch angenommen, der fremde Immunkörper und das vom Organismus loco produzierte Alexin treffen sich, so werden in sehr vielen Fällen die Immunkörper nicht diejenigen Vorbereiter der Bakterien sein, die für die betr. Alexine passen.

Also mit anderen Worten, mit der passiven Immunisierungsmethode können wir direkt nur darauf rechnen, die gerade im Blute befindlichen Bakterien zu erreichen. Ferner verändern sich diese Körper im Blute fremder Spezies sehr schnell.

Anders verhält es sich mit der erworbenen Immunität. Die durch Bakterien erzeugten Antikörper bleiben viel länger im Organismus, aber auch wenn sie schwinden, bleibt die Immunität erhalten.

Die Heilung von Infektionskrankheiten durch passiv immunisierende lytische Seren kann also von Erfolg sein, wenn die Bakterien von den Substanzen erreicht werden, speziell im Blute; in den meisten Fällen sind aber die Krankheitserreger in den Geweben, Oedemen etc. Wirken sie nun doch allgemein durch ihre Toxine, so wird die antitoxische Therapie die einzige sein, denn die lytischen Körper erreichen sie ja nicht, vor allem nicht in den Fällen, wo weitgehende histologische Veränderungen durch Exsudation, Granulation, Nekrose und Narbenbildung eingetreten, wie bei Tuberkulose; da wird die Heilung nicht durch lytische Wirkung zu stande kommen können — auch wenn die Bakterien lösbar wären —, sondern nur durch eine Veränderung der Disposition, vor allem der benachbarten Zellen. Eine präventive Immunisierung kommt natürlich a priori auf ein Reaktionsfähigmachen der Körperzellen hinaus, denn die Immunität besteht ja nach überstandenen Krankheiten weit länger als die im Blute nachweisbaren Immunkörper; sie liegt also in den Zellen. Folglich müssen wir annehmen, daß die Krankheiten für die Serumwirkung verschieden zugänglich sind, vor allem auch verschieden nach den histologischen Befunden.

Die klinisch so wichtige Erscheinung des Fiebers kann von diesem Standpunkte, wie mir scheint, aus seinem „Chemismus“ erklärt werden; ich gehe dabei aus von den Untersuchungen und Ideen von Krehl und Friedr. Müller.

Fieber entsteht durch Einfuhr bestimmter Dosen von Toxinen der Bakterien, aber auch durch Einführen von Eiweißkörpern körperfremder Art direkt ins Blut, die die Zellen des Organismus zerstören und Eiweißzerfall bedingen. Das Fieber wäre also nach Krehl eine Reaktion des Organismus gegen gewisse ins Blut gelangende fremdartige unassimilierbare Eiweißkörper — also allgemein nach unserer Auffassungsweise: die Reaktion auf stickstoffhaltige, körperfremde aggressive Kolloide. Alle diese Körper erzeugen nun im animalen Organismus mit ihnen zu schwer löslichen Kombinationen sich verbindende Gegenkörper (Antitoxine, Präzipitine), die ihrerseits oft noch ausgesprochener kolloider Art sind als die injizierten Körper. Dieser fast absolute Parallelismus zwischen Antikörperbildung und Fieberreaktion spricht für einen Zusammenhang (Friedr. Müller). Eiweißzerfall ist nicht allein genügend, denn bei sehr intensivem Eiweißzerfall bei P.-Vergiftung und Carcinom tritt kein Fieber auf (Krehl).

Wenn wir also nach dem annehmen dürfen, daß alle fiebererregenden Substanzen stickstoffhaltige körperfremde Kolloide sind, die Antikörper

erzeugen und den Eiweißzerfall erhöhen, so läßt sich daraus einiges ableiten über ihre Wirkungsweise.

Rein chemisch lassen sich diese Tatsachen nicht anfassen, weil Parallelen fehlen.

Wenn wir aber die spezifische Elektivität und event. gegenseitige Lösungstendenz mit anderen Kolloiden uns vorstellen, so ist es nahe liegend, daß aggressive Kolloide verwandte Kolloide an sich reißen können, z. B. aus Zellen, hauptsächlich auch stickstoffhaltige. Diesem langsam verlaufenden Vorgang entspricht die Inkubationszeit und das nachher für einige Zeit folgende Fieber. (Der Mechanismus des Fiebers ist dadurch natürlich nicht geklärt; aber die Tatsachen der Beobachtung haben einen Zusammenhang.) Also N-haltige aggressive Kolloide, wie die Toxine, erzeugen im animalen Körper in bestimmten Dosen Fieber, wenn sie den Eiweißzerfall erhöhen, und zwar nach mehreren Stunden.

Ich möchte mir erlauben, der Ungewohntheit wegen mit den Eigenschaften kolloider Körper zu rechnen, ein Bild zu entwerfen, das diesem Vorgang etwa entsprechen könnte, indem ich alles nur auf die für diese Körper festgestellten, speziell physikalischen Eigenschaften basiere. So kann ich auch den Gegensatz zur Ehrlich'schen Theorie klarer machen, der darin besteht, daß Ehrlich spezifische, chemische Affinitäten (Seitenketten) annimmt, während ich die überall in den Vordergrund tretenden physikalischen Eigenschaften, die nach dem Vorhergehenden die wichtigsten sind, besonders berücksichtigt.

Tatsache ist, daß z. B. die Toxine von Zellen absorbiert werden, und daß sie Antikörper erzeugen und Fieber, und daß sie sich mit diesem Antikörper zu inaktiven Verbindungen kombinieren.

Kommt also ein Toxinkomplex an eine Zelle heran, so wird er indifferent bleiben, wenn er nicht im stande ist, die Oberflächenspannung der Zelle zu verändern. Verändert er die Oberflächenspannung, resp. trifft er an dieser Stelle einen Komplex, mit dem er physikalische Affinität besitzt, so werden sich die beiden anziehen, und zwar wird dasjenige sich gegen das andere hin bewegen, das weniger Hindernisse hat. Das wird in den meisten Fällen das Toxin sein, denn es ist ja im allgemeinen aus einer Zelle ausgetreten, wird also auch in eine Zelle eintreten können, während ja der Komplex, der zu ihm Affinität hat, in der Zelle gehalten wird durch dieselben Faktoren, die ihn früher festhielten. Oder aber, er kann auch aus der Zelle gerissen werden durch den Einfluß des Toxins, und die Verbindung der Antikörperbildung kommt ins Blut und zerfällt. Denn auch sehr komplexe Eiweißkörper, die schwer in die Zelle eindringen, haben denselben Effekt.

Der Mechanismus der Entstehung und die Anregung zur vermehrten Produktion der Antikörper und ferner zur Vermehrung der diese produzierenden Zellen, speziell der Leukocyten, wird aus diesen Eigenschaften verständlicher, nämlich: bei der Verteilung dieser aggressiven Kolloide werden sie einen Teil der in den Zellen auf sie passenden Kolloide herausreißen oder binden und so das Gleichgewicht in den Zellen stören. Die Reaktion der Zelle ist wie immer eine Produktion, die mehr als den Defekt deckt.

Geht die Verbindung von den beiden passenden Körpern in der Zelle vor sich, so wird die schwer diffundierbare Verbindung liegen bleiben, einen Reiz auf die Zelle ausüben, und die Zelle antwortet z. B. mit vermehrter Produktion des gebundenen Kolloides oder sie teilt sich oder geht zu Grunde. (Nur ein kleiner Teil der Zellen wird während

dieser Zeit im Organismus zu Grunde gehen und ihre Kolloide, von denen nur ein Teil ungebundener Antikörper ist, frei geben.)

Das also eine Deutung des Zusammenhangs der festgestellten Vorgänge, welche von einer Temperaturerhöhung begleitet sind, die wir Fieber nennen.

Warum habe ich mir erlaubt, die Tatsachen über Immunität einer neuen Deutung zu unterziehen? Nur weil diese Anschauungsweise (im Gegensatz zu der rein chemischen) die in der Gegenwart und nächsten Zukunft wichtigsten Tatsachen zusammenfaßt und in den Vordergrund stellt, und scheinbar verschiedene Forschungsgebiete unter einheitlichere Gesichtspunkte bringt. Wenn sie das tut, hat sie wie jede Theorie als Arbeitshypothese ihre ephemere Berechtigung, bis die nun kräftig vorwärtsschreitende Eiweisschemie eine rationellere chemische Erklärung auf neuen Funden geschaffen.

Nachdruck verboten.

Ueber die künstliche Immunität gegen Staphylokokken.

Von Dr. Pröscher, Hamburg.

Das Problem der Staphylokokkenimmunität ist in den letzten Jahren von zahlreichen Forschern in Angriff genommen worden. Nicht allein nur von bakteriologischer, sondern auch von chirurgischer Seite aus hat man demselben erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt. Sind doch die Staphylokokken neben den Streptokokken die Ursache zahlreicher schwerer Erkrankungen mit ziemlich beträchtlicher Mortalität. Es war daher eine berechtigte Forderung, nach einer spezifischen Behandlung der Staphylomykosen zu suchen. Die glänzenden Resultate der Serumtherapie der Diphtherie ließen hoffen, daß es auch gelingen würde, die Staphylomykosen auf demselben Wege erfolgreich zu bekämpfen. Die von den verschiedensten Seiten ausgeführten Untersuchungen zeigten aber, daß die Immunität gegen Staphylokokken weit komplizierter liegt, als man von vornherein annehmen konnte. Es kann kein Zweifel darüber sein, daß das von den verschiedenen Autoren gewonnene Serum eine gewisse Schutzwirkung entfaltete, dieselbe war aber so schwach, daß von einer erfolgreichen therapeutischen Anwendung derselben keine Rede sein konnte. Wie ich bereits in meiner ersten Mitteilung¹⁾ über Antistaphylokokkenserum betont habe, ist für die therapeutische Verwendung desselben Bedingung, daß es die für die Staphylokokkeninfektion empfindlichen Tiere schützt. Ich glaube für mich die Priorität in Anspruch nehmen zu dürfen, als erster den exakten experimentellen Beweis erbracht zu haben, daß es sicher gelingt, Tiere gegen Staphylokokken passiv zu immunisieren. Auf eine Würdigung der zahlreichen Arbeiten, die über die Staphylokokkenimmunisierung erschienen sind, näher einzugehen, kann ich um so mehr verzichten, da dieselben, wie bereits erwähnt, zu keinem brauchbaren Resultat geführt haben. Von den verschiedenen Autoren, die sich mit der Immunisierung gegen Staphylokokken beschäftigt haben, dürfte Petersen²⁾ der einzige gewesen sein, der ein einigermaßen wirksames Serum in Händen hatte.

1) Deutsche med. Wochenschr. 1903. No. 11.

2) Petersen, Ueber Immunisierung und Serumtherapie bei der Staphylomycosis. (Bruns' Beiträge. Bd. XIX. 1897.)

Um ein hochwertiges Antistaphylokokkenserum zu gewinnen, muß man mit lebenden virulenten Staphylokokken immunisieren. Das Serum, mit welchem die folgenden Versuche angestellt sind, war von Ziegen und Pferden gewonnen.

Ehe ich auf die Besprechung der Tierversuche eingehe, werde ich zunächst meine Resultate über die Agglutination der Staphylokokken mitteilen.

Agglutination der Staphylokokken.

Wie ich bereits in meiner ersten Mitteilung berichtet habe, werden sämtliche Staphylokokken, die aus menschlichem Eiter in Reinkultur gezüchtet waren, von dem Staphylokokkenserum agglutiniert, während diejenigen, die aus der Luft, der normalen Haut und Vaccine isoliert waren, durch das Serum nicht beeinflusst werden. Es stimmen diese Resultate mit den Untersuchungen von Neisser und Wechsberg¹⁾ überein, die fanden, daß nur die Traubenkokken pathogenen Ursprungs, Staphylolysin bezw. Leukocidin produzieren, während den saprophytischen Kokkenarten diese Eigenschaft fehlt. Während der Drucklegung meiner ersten Mitteilung erschien die Arbeit von Kollé und Otto, die Differenzierung der Staphylokokken mittelst der Agglutination²⁾. Kollé und Otto immunisierten Kaninchen intraperitoneal mit abgetöteten Staphylokokkenkulturen in steigenden Dosen, so daß die Tiere schließlich 60 Agarkulturen auf einmal appliziert bekamen. Sie erhielten auf diese Weise ein Serum, das noch bis zu einer Verdünnung von 1 : 1200 agglutiniert. Für die Gewinnung agglutinierender Sera dürfte sich die intravenöse Immunisierung mit abgetöteten Kulturen sehr empfehlen, da man auf diese Weise viel schneller zum Ziele gelangt und ein bedeutend stärker agglutinierendes Serum als bei intraperitonealer Immunisierung erhält. Was die Methodik der Agglutination anbetrifft, so dürfte dieselbe, wie sie Kollé und Otto angeben, sehr zeitraubend sein. Ich verfare so, daß ich die Serumverdünnung auf 1 ccm auffülle und dann 1 ccm gut durchgeschüttelter Staphylokokkenbouillonkultur zugebe.

Die Bouillonkultur ist vorher durch dünnes, steriles Filtrierpapier, das mit Kochsalzlösung angefeuchtet ist, filtriert, um grobe Partikel zurückzuhalten. Die Mischung von Serum und Kultur wird dann in kleine Blockschälchen und dieselben in den Brutschrank von 37° gebracht. Nach Ablauf von 2 Stunden werden dieselben bei schwacher Vergrößerung (60–70fach) und gesenktem Kondensator untersucht. Die Agglutination läßt sich in den Blockschälchen ausgezeichnet beobachten und erkennt man dieselbe schon bei makroskopischer Betrachtung. Die Staphylokokken sind zu kleinen Häufchen verklumpt, während die überstehende Flüssigkeit vollkommen klar ist. Die Kontrolle ist gleichmäßig getrübt. Wenn Kollé und Otto angeben, daß nach Ablauf von einer halben Stunde die Agglutination schon als beendet anzusehen ist, so dürfte dies nach meinen Beobachtungen nicht der Fall sein. Nach Ablauf von einer halben Stunde beginnt die Agglutination gewöhnlich einzusetzen und nach Verlauf von 2 Stunden beendet zu sein. Ich stimme Kollé und Otto vollkommen bei, daß die makroskopische Beobachtung viel für sich hat und der mikroskopischen mit starken Systemen vorzuziehen ist. Wenn man aber, wie ich es für die Typhusagglutination³⁾

1) Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. XXX. 1901.

2) Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. XLI. 1902. p. 369.

3) Centralbl. f. Bakt. Bd. XXXI. 1902. No. 9. p. 400.

beschrieben habe, die Untersuchung bei schwacher Vergrößerung (60 bis 70fach) vornimmt, so läßt sich die Grenze derselben viel schärfer bestimmen als bei rein makroskopischer Beobachtung. Bei so schwacher Vergrößerung ist jede Verwechslung mit der Pseudoagglutination ausgeschlossen. Bedingung ist, daß man einwandfreie Kontrollen in reiner physiologischer Kochsalzlösung vornimmt. Tabelle 1 gibt einen Ueberblick über die Herkunft der zur Agglutination verwandten Staphylokokkenstämme.

Tabelle 1.
Herkunft der Staphylokokkenstämme.

a) Aureusstämme:		No. 16. Eiter? Jahrelang fortgezüchteter Stamm.
No. 1. Furunkel der Unterlippe.		No. 17. Glutäalabsceß.
No. 2. Vaccine Köln.		No. 18. Nierenabsceß.
No. 3. Ekzem.		No. 19. Luft.
No. 4. Vaccine I.		No. 20. Empyem der Brusthöhle.
No. 5. Furunkel.		No. 21. Osteomyelitis des Unterschenkels.
No. 6. Vereitertes Kniegelenk.		
No. 7. Ekzem.		b) Albusstämme:
No. 8. Vaccine Stettin.		No. 22. Haut.
No. 9. Luft.		No. 23. Schulterabsceß, wuchs spärlich neben Staphylococcus aureus.
No. 10. Panaritium.		No. 24. Normale Haut.
No. 11. Mastitis puerperalis.		No. 25. " " "
No. 12. Mammaabsceß.		No. 26. Ekzem. " "
No. 13. Muskelabsceß.		No. 27. Comedo.
No. 14. Vaccine II.		No. 28. Reinkultur aus Hautabsceß.
No. 15. Angina.		

Tabelle 2.
Agglutinationstiter mit Ziegenimmunserum.

No.	Normales Ziegen- serum agglutiniert bis zur Verdünnung	Ziegenimmunserum agglutiniert bis zu einer Verdünnung	No.	Normales Ziegen- serum agglutiniert bis zur Verdünnung	Ziegenimmunserum agglutiniert bis zu einer Verdünnung
1	1:20	1:2560	15	1:80	1:320
2	0	0	16	0	1:160
3	1:10	1:640	17	1:10	1:320
4	0	0	18	angedeutet	1:640
5	1:40	1:640	19	0	0
6	1:10	1:320	20	1:20	1:1260
7	angedeutet	1:640	21	1:10	1:640
8	0	0	22	0	0
9	0	0	23	0	0
10	1:5	1:1280	24	0	0
11	1:20	1:2560	25	0	0
12	1:10	1:2560	26	0	1:320
13	0	1:1280	27	0	0
14	0	0	28	0	1:640

Wie ein Blick auf Tabelle 2 zeigt, wird durch normales Ziegen-
serum ein Teil der Staphylokokken agglutiniert, ein anderer Teil gar
nicht beeinflußt. Durch das Immunserum werden No. 1, 3, 5, 6, 7, 10,
11, 13, 15, 16, 17, 18, 20 und 21 in mehr oder minder starker Konzen-
tration agglutiniert. Dieselben bilden alle Staphylolysin. No. 2, 4, 8,
9, 14, 19, 20, 23, 24, 25 und 27 werden nicht agglutiniert, dieselben
produzieren auch kein Hämolyisin, sie sind also von den pathogenen
Staphylokokken abzutrennen. Die Differenzen des Titer dürften weniger
mit der Virulenz, wie Kolle und Otto annehmen, sondern mit dem
verschiedenartig gebauten Rezeptorenapparat der Staphylokokken in Zu-
sammenhang zu bringen sein. Diese Erscheinung beobachten wir auch

bei der Agglutination anderer Bakterien-species, so z. B. beim Typhus. Es gibt Typhusstämme, die von einem Typhusserum bereits in hoher Verdünnung vollkommen agglutiniert werden, während andere, ebenfalls echte Typhusstämme einer viel höheren Konzentration bedürfen, um vollkommen agglutiniert zu sein. Die Erklärung dieser Tatsachen ist nicht schwer, wenn wir die Ehrlich-Morgenrothschen¹⁾ Anschauungen über die hämolytischen Immunkörper auf die Agglutinine übertragen. Dieselben konnten nachweisen, daß die hämolytischen Immunkörper nicht eine einheitliche Substanz darstellen, sondern sich aus einer Reihe sogenannter Partialimmunkörper zusammensetzen, die untereinander sowohl in ihren bindenden Gruppen als auch an Zahl verschieden sind. Immunisiert man z. B. mit dem Blut des Meerschweinchens A das Kaninchen A, mit dem Blute des Meerschweinchens B das Kaninchen B, und prüft dann das Serum dieser Kaninchen auf seinen hämolytischen Wert gegenüber Meerschweinchenblut, so wird man finden, daß das Serum des Kaninchens A die Meerschweinchenblutkörperchen in anderer Konzentration lösen wird, als das Serum des Kaninchens B. Die Immunsera dieser beiden Tiere enthalten also, trotzdem sie mit der gleichen Blutart immunisiert sind, nicht die gleichen Rezeptoren, sonst müßte der Lösungskoeffizient der gleiche sein, vorausgesetzt, daß der Komplementgehalt derselbe ist. Die Mischung der beiden Sera wird die Blutkörperchen in anderer Konzentration lösen, als jedes der Sera allein. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß die Zellen ein und derselben Species biologisch nicht gleichwertig sind, sondern eine große individuelle Verschiedenheit ihres Rezeptorenapparates erkennen lassen. Die gleichen Verhältnisse finden wir bei der Immunisierung mit Bakterien. Es ist also gar nichts Auffallendes, daß durch das Staphylokokkenserum nicht sämtliche Staphylokokken in gleicher Konzentration agglutiniert werden. Die Rezeptorenapparate der einzelnen Staphylokokkenstämme sind nicht alle gleichartig gebaut. Es werden also durch das Staphylokokkenserum und diejenigen Staphylokokken in annähernd derselben Konzentration agglutiniert werden, welche die gleichen Rezeptoren besitzen wie derjenige Staphylococcus, der zur Immunisierung verwandt wurde.

Die Wertbemessung des Antistaphylokokkenserums.

Für die therapeutische Verwendung des Staphylokokkenserums ist es von größter Wichtigkeit, Sera von genau bestimmtem Wert anzuwenden, da nur auf solchen eine exakte klinische Prüfung basieren kann. Ich brauche nur an die Wertbestimmung des Diphtherieheilserums zu erinnern, dessen exakte Wertbemessung erst durch Ehrlichs klassische Untersuchungen über die Konstitution des Diphtheriegiftes ermöglicht wurde und für die erfolgreiche therapeutische Verwendung desselben von ausschlaggebender Bedeutung war. Die ungünstigen Resultate, die im Anfang mit dem Diphtherieheilserum namentlich in England erzielt wurden, waren nur darauf zurückzuführen, daß die verwandten Sera für die therapeutische Verwendung viel zu schwach waren. Erst die Einführung der Ehrlichschen Prüfungsmethode der Serum-Giftmischung, die jetzt allgemein acceptiert ist und die für die gleichmäßige Stärke des Diphtherieheilserums die größte Sicherheit bietet,

1) Ehrlich und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1901; siehe auch Durham, Journ. of experiment. med. 1901.

sind die therapeutischen Erfolge der Serumbehandlung allgemein anerkannt worden.

Für die Wertbestimmung des Staphylokokkenserums liegen die Verhältnisse ungleich schwerer, da wir nicht mit Serum-Giftmischungen, sondern mit lebenden Kulturen arbeiten müssen. Obwohl der *Staphylococcus lösliche* Gifte bildet, auf die wir in Gestalt der roten und weißen Blutkörperchen des Kaninchens sehr empfindliche Reagentien besitzen, so sind wir doch genötigt, mit lebenden Kulturen zu arbeiten, da die intracellulären Gifte, denen ein Hauptteil der Giftwirkung der Staphylokokken zukommt, nicht in die Kulturflüssigkeit übergehen und wir für dieselben keine bioskopische Prüfungsmethode besitzen. Die Giftwirkung der Staphylokokken kombiniert sich mithin aus der Wirkung des Staphylolysin, Leukocidins und der intracellulären Gifte. Die Wirkung der intracellulären Gifte können wir nur an Tieren, die für die Staphylokokkeninfektion empfänglich sind, prüfen. Die Prüfung im Reagenzglas ist nur eine partielle und kann also den Tierversuch nicht ersetzen. Was die Empfänglichkeit der einzelnen Tierspecies gegenüber den Staphylokokken anbetrifft, so habe ich bereits in meiner ersten Arbeit mitgeteilt, das nur Kaninchen für die Prüfung in Betracht kommen. Dieselben sind subkutan und intraperitoneal gegenüber den Staphylokokken sehr verschieden empfindlich und vertragen häufig große Dosen ohne zu sterben, nur bei Einführung in die Blutbahn gehen dieselben ausnahmsweise bei genügend großen Dosen unter typischen Erscheinungen zu Grunde. Die Größe der tödlichen Dose ist so zu bemessen, daß Kaninchen im Gewicht von 2500—3000 g in 2×24 , längstens in 3×24 Stunden getötet werden. Nach zahlreichen Bestimmungen genügen 0,5 ccm einer virulenten Staphylokokkenbouillonkultur, um die Tiere in der angegebenen Zeit sicher zu töten. Nach Injektion von 0,1 ccm gehen dieselben erst nach Ablauf von 6—7 Tagen zu Grunde; es dürfte dies ungefähr die einfach tödliche Dose sein. In Tabelle 3 lasse ich eine Anzahl Versuche zur Bestimmung der 5-fach tödlichen Dose folgen:

Tabelle 3.

Tier No.	Dosis	Art der Injektion	Datum	Ergebnis
No. 1	0,5 ccm	Staphylokokkenbouillonkultur intrav.	am 31. XI. 02,	+ am 1. XII. 02
" No. 2	0,1	"	" 31. XI. 02,	+ " 6. XII. 02
" No. 4	0,5	"	" 4. XII. 02,	+ " 5. XII. 02
" No. 5	0,5	"	" 6. XII. 02,	+ " 9. XII. 02
" No. 21	0,5	"	" 25. XII. 02,	+ " 26. XII. 02
" No. 42	0,5	"	" 14. I. 03,	+ " 16. I. 03
" No. 9	0,5	"	" 5. I. 03,	+ " 6. I. 03

Ehe ich auf die Prüfungsmethode eingehe, will ich zunächst den Krankheitsverlauf der mit Staphylokokken infizierten Tiere kurz beschreiben. 2—3 Stunden nach der Infektion fangen die Tiere an zu fiebern und nehmen keine Nahrung mehr auf. Nach ca. 15—20 Stunden tritt gewöhnlich Lähmung der beiden Hinterbeine ein, die allmählich auch auf die vorderen Extremitäten übergreift, so daß die Tiere auf der Seite liegen. Die Atmung ist stark beschleunigt und unter allgemeinen Konvulsionen tritt der Tod ein.

Der Sektionsbefund der an Staphylokokkeninfektion zu Grunde gegangenen Tiere weist makroskopisch keine besonderen Veränderungen auf. Außer einer starken Hyperämie der Bauch- und Brustorgane sind weiter keine grobanatomischen Veränderungen zu konstatieren. Zur Ausbildung von Abscessen kommt es gewöhnlich nicht, da der Krank-

heitsverlauf zu kurz ist. Mikroskopisch läßt sich in den meisten Organen trübe Schwellung konstatieren.

Um die Stärke des Serums bestimmen zu können, wird folgendermaßen verfahren: die Tiere bekommen 24 Stunden vor der Infektion das Serum subkutan injiziert und werden dann nach Ablauf von 24 Stunden intravenös mit Staphylokokken infiziert. Tabelle 4 veranschaulicht die Wertbestimmung des Ziegen- und Pferdeimmenserums.

Tabelle 4.

Ziegenimmenserum.

Tier No.	Serum ccm	subk. am	16. XI. 02	0,5 ccm Staphylokokkenkultur am	17. XI. 02	† am	18. XI. 02
No. 21	0,5	"	24. XI. 02	0,5	"	25. XI. 02	† " 26. XI. 02
No. 16	1,0	"	16. XI. 02	0,5	"	17. XI. 02	† " 19. XI. 02
No. 20	1,5	"	24. XI. 02	0,5	"	25. XI. 02	lebt
No. 29	1,5	"	9. XII. 02	0,5	"	10. XII. 02	lebt
No. 30	1,5	"	9. XII. 02	0,5	"	20. XI. 02	lebt
No. 17	2,0	"	19. XI. 02	0,5	"	20. XI. 02	lebt
No. 28	2,0	"	9. XII. 02	0,5	"	10. XII. 02	lebt
No. 18	3,0	"	19. XI. 02	0,5	"	20. XI. 02	lebt

Pferdeimmenserum.

Tier No.	Serum ccm	subk. am	30. I. 03	0,5 ccm Staphylokokkenkultur am	31. I. 03	† am	1. II. 03
No. 45	1,0	"	26. I. 03	0,5	"	27. I. 03	lebt
No. 41	1,5	"	15. I. 03	0,5	"	16. I. 03	lebt
No. 43	2,5	"	15. I. 03	0,5	"	16. I. 03	lebt
No. 44	4,0	"	15. I. 03	0,5	"	16. I. 03	lebt

Gibt man das Serum subkutan und zu gleicher Zeit das Gift intravenös, so sterben die Tiere in derselben Zeit wie die Kontrolltiere, die nur Gift intravenös erhalten haben. Bei gleichzeitiger Injektion von Gift und Serum werden die Toxine so schnell verankert, daß dieselben von den Antitoxinen nicht mehr neutralisiert werden können. In Tabelle 5 lasse ich zunächst die Versuche bei gleichzeitiger Injektion von Gift und Serum folgen.

Tabelle 5.

Tier No.	Serum ccm	subkut. am	13. XI. 02	† am	15. XI. 02
No. 14	0,5	0,1	13. XI. 02	†	15. XI. 02
No. 15	0,5	0,15	13. XI. 02	†	15. XI. 02
No. 10	0,5	0,2	11. XI. 02	†	14. XI. 02
No. 8	0,5	0,25	6. XI. 02	†	11. XI. 02
No. 7	0,5	0,5	6. XI. 02	†	9. XI. 02
No. 6	0,5	1,0	6. XI. 02	†	9. XI. 02
No. 11	0,5	1,5	7. XI. 02	†	9. XI. 02

Ferner wurde versucht, ob bei intravenöser Injektion des Serums geringere Mengen ausreichen, um die tödliche Dose zu neutralisieren. Das Antitoxin wurde zu gleicher Zeit mit dem Gift injiziert. Wie folgende Versuche zeigen, traf die eben gemachte Voraussetzung leider nicht zu. Es wurde nur eine Verzögerung des Todes herbeigeführt, indem die Serumtiere die Kontrolltiere um einige Tage überlebten.

Tabelle 6.

Serum und Kultur intravenös zu gleicher Zeit injiziert.

Tier No.	Serum ccm	Kultur ccm	intravenös,
27a	8. XII. 02	0,1	0,5 ccm Staphylokokkenkultur intravenös,
	9. XII. 02		munter,
	10. XII. 02		beide Hinterbeine steif,
	11. XII. 02		beide Vorder- und Hinterbeine gelähmt,
	12. XII. 02		†.

- Tier No. 27b 8. XII. 02 0,3 ccm Serum und 0,5 ccm Staphylokokkenkultur intravenös,
 9. XII. 02 munter,
 10. XII. 02 beide Hinterbeine steif,
 11. XII. 02 beide Vorder- und Hinterbeine gelähmt,
 12. XII. 02 †.
- Tier No. 27e 8. XII. 02 1,0 ccm Serum und 0,5 ccm Staphylokokkenkultur intravenös,
 9. XII. 02 munter,
 10. XII. 02 beide Hinterbeine steif,
 11. XII. 02 beide Hinterbeine gelähmt,
 12. XII. 02 beide Hinterbeine und Vorderbeine gelähmt,
 13. XII. 02 †.

Ebensowenig wurde ein Erfolg erzielt, wenn das Serum 24 Stunden vor der Infektion gegeben wurde.

Um das Prüfungsverfahren zu vereinfachen, wurde das Serum mit der Staphylokokkenkultur gemischt, die Mischung $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen und dann intravenös injiziert. Wie folgende Versuche erläutern, fielen dieselben aber so unregelmäßig aus, daß von dieser Methode Abstand genommen werden mußte.

Tabelle 7.
 Serum und Gift gemischt intravenös injiziert.

			Ziegenimmunserum.	
Tier No. 38	1,5 ccm Serum	+	0,5 Staphylokokkenkultur	11. XII. 02 lebt
„ No. 38q	1,5 „	„	0,5 „	11. XII. 02 † am 18. XII. 02
			Pferdeimmunserum.	
Tier No. 46	2 ccm Serum	+	0,5 Staphylokokkenkultur	30. I. 03 † am 8. II. 03
„ No. 48	1 „	„	0,5 „	30. I. 03 lebt.

Für die therapeutische Verwendung des Staphylokokkenserums ist es von größter Bedeutung, ob dasselbe bei bereits manifester Infektion noch heilende Wirkung entfaltet. Leider sind die Versuche, die ich in großer Anzahl angestellt habe und von denen ich nur einige mitteilen will, bis jetzt alle negativ ausgefallen, da trotz der größten Dosen Serum die Tiere ohne Ausnahme zu Grunde gingen. Man kann die Staphylokokkeninfektion der Tetanusinfektion in dieser Beziehung an die Seite stellen. Bei der Tetanusinfektion gelingt es aber wenigstens, in den ersten Stunden nach der Infektion die Tiere noch mit Antitoxin zu retten, während dies bis jetzt bei der Staphylokokkeninfektion unmöglich ist. Die Bindung der Staphylokokkentoxine scheint eine so feste zu sein, daß selbst die größten Dosen Serum ohne Wirkung sind.

Tabelle 8.
 Heilversuche mit Staphylokokkenserum.

Tier No. 25	am 28. XI. 02 um 2 $\frac{1}{2}$ Uhr p. m.	0,5 ccm Staphylokokkenkultur intravenös,
	um 6 $\frac{1}{2}$ Uhr p. m.	10 ccm Staphylokokkenserum subkutan, † am 29. XI. 02.
Tier No. 22	am 24. XI. 02 um 2 Uhr p. m.	0,5 ccm Staphylokokkenkultur intravenös,
	um 4 Uhr p. m.	10 ccm Staphylokokkenserum subkutan, † am 1. XII. 02.
Tier No. 36	am 6. XII. 02 um 10 Uhr a. m.	0,5 ccm Staphylokokkenkultur intravenös
	um 10 $\frac{1}{4}$ Uhr a. m.	20 ccm Staphylokokkenserum subk., † am 8. XII. 02.

Ueber die Wirkungsweise des Antistaphylokokkenserums.

Wie allgemein bekannt, unterscheiden wir antitoxisch und bakterizid wirkende Heilsera. Die Wirkung der ersten ist eine rein chemische, indem sie die Toxine neutralisieren, die Wirkung der letzteren besteht darin, daß sie die Bakterienzelle zur Auflösung bringen. Damit ist ihre Wirkung aber noch nicht erschöpft, sie müssen auch noch eine antitoxische Funktion haben, denn durch die Bakteriolyse werden die intra-

zellulären Gifte frei und würden ihren deletären Einfluß auf den Organismus ausüben, wenn dieselben nicht durch Antitoxin neutralisiert würden. Der Mechanismus der bakteriziden Sera ist weit komplizierter als der der antitoxischen. Während bei den antitoxischen Sera nur ein Körper in Betracht kommt, sind für die Wirkung der bakteriziden Sera zwei Substanzen nötig, der stabile Immunkörper und das labile Komplement. Nach diesen kurzen theoretischen Erörterungen wollen wir nun die Frage zu beantworten suchen, welche Wirkung dem Staphylokokkenserum zukommt. Was zunächst die bakterizide Wirkung des Staphylokokkenserums anbetrifft, so muß ich im Gegensatz zu Schattentfroh konstatieren, daß demselben im Reagenzglas jede bakterizide Wirkung abzusprechen ist. Es wurde zur Komplementierung des inaktiven Ziegenimmunsersums sowohl normales Ziegen-, Menschen-, Kaninchen-, Meerschweinchen- und Pferdeimmenserum benützt, aber eine keimtötende Wirkung konnte in keinem Falle erzielt werden. Die Reagenzglasversuche wurden nach der Neisserschen Methode angestellt. Ebenso wenig konnte in der Bauchhöhle immunisierter Meerschweinchen, Mäuse, Kaninchen eine Bakteriolyse der Staphylokokken beobachtet werden. Den Versuchstieren wurde 24 Stunden vor der Infektion Staphylokokkenserum intraperitoneal injiziert. Zur Kontrolle wurde eine Anzahl Tiere mit normalem Ziegen Serum vorbehandelt und ebenfalls nach 24 Stunden mit Staphylokokken infiziert. Entnimmt man nun nach 30 Minuten den immunisierten wie den mit normalem Ziegen Serum vorbehandelten Tieren etwas Exsudat aus der Bauchhöhle und untersucht dasselbe mikroskopisch (im hängenden Tropfen oder Trockenpräparat), so findet man, daß bei den immunisierten Tieren sämtliche Staphylokokken von vorwiegend großen mononukleären Leukocyten aufgenommen sind, polynukleäre Zellen sind nach dieser Zeit nur spärlich vorhanden. Bei den mit normalem Ziegen Serum vorbehandelten Tieren findet man ebenfalls eine mäßig starke Leukocytose, aber die größte Mehrzahl der Staphylokokken liegt noch frei im Exsudat, nur wenige sind von den Leukocyten aufgenommen. Nach ca. einer Stunde sind bei den immunisierten Tieren die mit Staphylokokken beladenen großen mononukleären Zellen verschwunden und man findet jetzt zahlreich polynukleäre Zellen, die zum Teil noch mit Staphylokokken angefüllt sind. Nach Ablauf von 24 Stunden ist die Leukocytose fast vollkommen verschwunden und ist nur noch ein spärliches Exsudat mit wenig Leukocyten vorhanden. Das Staphylokokkenserum übt also einen stimulierenden Einfluß auf die Leukocyten aus. Wir können uns diese Wirkung nur dadurch erklären, daß die Leukocyten bzw. ihr Protoplasma das Antitoxin binden. Welcher Natur diese Bindung ist, ob chemisch oder physikalisch, lasse ich vorläufig dahingestellt. Durch die Aufnahme des Antitoxins werden die Leukocyten positiv chemotaktisch und nehmen begierig die Kokken auf. Bei den nicht immunisierten Tieren verhält sich die größte Mehrzahl der Leukocyten negativ chemotaktisch. Die Stärke der Phagocytose ist zugleich ein Maßstab für die Virulenz der Staphylokokken, je virulenter dieselben sind, desto geringer ist die Phagocytose, ja sie kann bei sehr virulenten Staphylokokken vollkommen fehlen, je weniger virulent dieselben sind, um so stärker ist dieselbe. Die Bedeutung der Phagocytose im Kampf mit den Staphylokokken erblicke ich darin, daß dieselben nicht eine momentane Abtötung der Staphylokokken bewirken, sondern dieselben in ihrer Virulenz abschwächen. Die Auflösung der Staphylokokken in den Leukocyten

scheint sehr langsam vor sich zu gehen. So konnte ich aus der Peritonealflüssigkeit von immunisierten Mäusen noch nach 6 Tagen Staphylokokken züchten, trotzdem dieselben in den Leukocyten aufgespeichert waren. Ferner habe ich bei einem Kaninchen, das bei der Wertbestimmung am Leben blieb, und nach 2 Monaten einen Gelenkabsceß bekam, aus dem Eiter desselben Staphylokokken züchten können, deren Identität durch die Agglutination festgestellt wurde. Der Absceß hatte sich spontan entleert und das Tier blieb am Leben. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß von einer direkten keimtötenden Wirkung des Staphylokokkenserums keine Rede sein kann und dasselbe ausschließlich antitoxisch wirkt, indem es die von den Staphylokokken produzierten Gifte unschädlich macht und indirekt die Leukocyten im Kampfe mit den Staphylokokken unterstützt und dieselben befähigt, die Staphylokokken in ihrer Virulenz abzuschwächen und allmählich aufzulösen.

Das Antistaphylokokkenserum ist von dem Serum-Laboratorium „Ruete-Enoch“ in Hamburg zu beziehen.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität.

[Aus dem hygienischen Institute der deutschen Universität Prag
(Vorstand: Prof. Hueppe).]

Mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.

VII. Versuch einer Erklärung der Milzbrandempfindlichkeit des Kaninchens.

Von

Dozent Dr. **Oskar Bail**
Assistenten des Institutes.

und Dozent Dr. **Alfred Pettersson**
Stockholm.

Wenn man es unternimmt, die natürliche Empfänglichkeit oder Widerstandskraft gegen die Milzbrandinfektion mit Rücksicht auf die milzbrandfeindlichen Eigenschaften des Organismus der Versuchstiere zu untersuchen, so bieten sich wie von selbst zwei anscheinend ganz widerspruchsvolle Probleme dar. Das eine betrifft die Empfänglichkeit des Kaninchens bei ausgesprochenstem milzbrandtötenden Vermögen des Blutes und Blutserums, das zweite die relative Immunität des Hundes¹⁾ und die fast absolute des Huhnes bei meist vollständigem Fehlen jeder keimfeindlichen Wirkung der Körpersäfte. Dieser Widerspruch, der in seiner Verfolgung zu der paradoxen Erscheinung führt, daß ein Kaninchen, dessen extravaskuläres Blut in der Menge von 1 ccm Tausende von Milzbrandbacillen binnen kürzester Zeit abtötet, während das gleiche Tier der intravaskulären Einführung von 5 oder 10 Stäbchen widerstandslos erliegt, ist seit Lubarsch immer wieder hervorgehoben worden²⁾ und bildete eines der stärksten Argumente

1) Im ganzen scheint die natürliche Immunität des Hundes entweder nicht besonders stark ausgesprochen zu sein oder sehr stark von der Rasse abzuhängen. Es gingen ausgewachsene Hunde mehrfach auf Injektion von 1 und selbst $\frac{1}{2}$ ccm Bouillonkultur binnen 3 Tagen zu Grunde.

2) So neuestens bei Fischer, Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl. p. 339.

gegen die Verwertung der Buchnerschen Alexine zur Erklärung der natürlichen Immunität.

Es ist zunächst nicht viel gewonnen, wenn man nachweist, daß auch der Hund über milzbrandfeindliche Fähigkeiten in seinem Organismus verfügt. Die auf den ersten Blick so ansprechenden Erklärungsversuche von Denys und Kaisin¹⁾, wonach der Hund erst nach erfolgter Milzbrandinfektion bakterizide Stoffe in seinem Blute erkennen läßt, haben freilich der Nachprüfung bisher nicht standhalten können, wohl aber hat es sich gezeigt, daß der Hund in seinen Leukocyten ein milzbrandtötendes Agens besitzt²⁾. Es stellte sich ferner heraus, daß durch Mischung von ganz unwirksamem Hunde- und Hühnerblute mit so geringen Mengen von Kaninchenserum, daß dieses an sich nicht mehr wirkungsfähig ist, starke milzbrandtötende Erscheinungen ausgelöst werden.

Seitdem durch Ehrlichs und seiner Schüler Arbeiten unzweifelhaft gezeigt wurde, daß die Buchnerschen Alexine als einheitliche, einfach wirkende Körper nicht existieren, daß vielmehr jede Keimtötung im normalen wie im spezifischen Serum, wo Bordet die Verhältnisse zuerst erklärte, auf dem Zusammenwirken von Immunkörper und Komplement beruht, ist die Erklärung dieses Befundes sehr einfach und leicht geworden: Der Hund oder das Huhn besitzt Immunkörper, der durch das vom Kaninchenserum gelieferte Komplement wirkungsvoll ergänzt wird.

War diese Erkenntnis ein Fortschritt, so war es doch zunächst nur ein solcher in der allgemeinen Kenntnis der Bluteigenschaften verschiedener Tiere. Die Lösung der oben angedeuteten beiden Probleme brachte er nicht.

Denn ganz abgesehen davon, daß die Empfänglichkeit des Kaninchens nicht im geringsten verständlich wurde, ergaben weiter vergleichende Untersuchungen alsbald³⁾, daß auch das Serum vieler anderer Tiere durch Kaninchenkomplemente wirksam werden kann, und darunter befanden sich gerade diejenigen, welche im höchsten Grade natürlich empfänglich für Milzbrand sind, das Schaf und das Rind. Wollte man die Anwesenheit eines Immunkörpers im Blute des Huhnes und Hundes als Erklärungsgrund für ihre Unempfindlichkeit gelten lassen, so war nicht einzusehen, warum nicht das Schaf und namentlich das Rind immun seien. Es war alles nur noch verwickelter geworden.

Gleichwohl unterliegt es keinem Zweifel, daß das Gelingen oder das Ausbleiben einer Milzbrandinfektion mit Vorgängen der Keimabtötung innerhalb des betreffenden Tieres zusammenhängen muß. Mag auch in letzter Linie der Milzbrandtod auf eine Vergiftung durch das bisher so gänzlich unfaßbare Anthraxtoxin zurückzuführen sein, zur Bildung desselben ist doch ein starkes Wuchern der eingedrungenen Bacillen offenbar notwendig. Wenn dieses Wachstum im Körper des Kaninchens trotz der stärksten bakteriziden Eigenschaften seiner Säfte stattfindet, so muß im Körper eine Hemmung existieren, die außerhalb des Körpers im Serum wegfällt. Und umgekehrt, wenn im Huhne die injizierten Bacillen sich nicht zu vermehren im stande sind, so muß im Organismus eine Abtötung möglich sein, die im extravaskulären Blute nicht nachweisbar ist.

Es galt also, beim Kaninchen die supponierte Hemmung, beim

1) Denys et Kaisin, La cellule. T. IX. 1898.

2) Bail, Dieses Centralbl. Bd. XXVII. 1900. p. 10 u. 517. — Pettersson, Ebenda. 1903.

3) Bail sowie Bail und Pettersson, dieses Centralbl. 1903.

Huhne die vorausgesetzte Abtötungsmöglichkeit aufzufinden. Für ersteres liegt ein gewisser Fingerzeig seit langer Zeit vor.

Das Blut eines milzbrandigen Kaninchens behält seine keimtötenden Eigenschaften und auch seinen Komplementgehalt¹⁾. Es kann also im Tierkörper die Aufzehrung der beiden bei der Bakterienvernichtung wirkenden Komponenten nicht stattgefunden haben und es erhebt sich sofort die Frage, ob denn diese Stoffe im Tiere überhaupt dem Milzbrandbacillus gegenüber in Tätigkeit treten können.

Daß durch Studium des Blutes und Serums im Reagenzglas keine weiteren Fortschritte zu machen seien, wurde bald durch eine einfache Ueberlegung klar. Wie bereits dargelegt wurde, gelingt es, durch Zusatz toter oder auch lebender Milzbrandkulturen ein Kaninchenserum unwirksam zu machen. Die dafür erforderliche Anzahl von Bacillen schwankt zwar beträchtlich, ist aber immer relativ sehr bedeutend und liegt im Mittel etwa bei $\frac{1}{3}$ Agarkultur für 1 ccm Serum. Nun mag man sich das Wachstum der Bacillen im Körper beliebig groß vorstellen: so viele, wie $\frac{1}{3}$ Agarkultur enthält, kommen sicher nicht auf die entsprechende Menge intravaskulären Blutes. Das, was im Reagenzglasversuche gefunden werden kann, ist einfach auf die natürlichen Verhältnisse nicht übertragbar.

Weit aussichtsvoller wurde das Studium der Körperorgane des Kaninchens, und zwar sowohl für sich allein als in Verbindung mit dem Blute des gleichen Tieres. Ueber solche Organversuche, und zwar mit Serum fremder Tierarten, wurde bereits berichtet²⁾. Sie lieferten sehr interessante Resultate, die aber für die hier zunächst interessierende Frage noch nicht in Betracht kommen. Immerhin geht daraus bereits hervor, daß die blutleeren Organe des Kaninchens in indifferenten Flüssigkeit nicht bakterizid wirken, daß also die beiden notwendigen Dinge, Immunkörper und Komplement, entweder nicht gleichzeitig in den Organen zugegen sind oder doch nicht in geeigneter Weise zum fertigen Bakteriolyisin zusammentreten können. Nur die Leukocyten eines Aleuronatexsudates und öfters die aus Lymphdrüse gewonnenen besitzen eine gewisse Wirksamkeit, die aber auch schwankt und jedenfalls mit der Keimvernichtung des Blutes nicht zu vergleichen ist.

Tabelle I.

Organe eines 24 Stunden vorher mit Aleuronat intraperitoneal injizierten Kaninchens, das mit NaCl-Lösung durchspült wird. Die Organe werden in schwach peptonhaltiger NaCl-Lösung zerrieben und 1 Stunde bei 37° gehalten. Hierauf wird die obestehende Flüssigkeit abgossen und verwendet. Nur die als „Leukocytenextrakt“ bezeichneten Proben wurden zellfrei zentrifugiert.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) Extrakt aus Exsudatleukocyten mit NaCl		} ca. 4000
2) „ „ „ „ „ „ „ „ $\frac{1}{3}$ Std. 58°		
3) Leukocyten aus Exsudat in NaCl		2616
4) „ „ „ „ „ „ „ „ $\frac{1}{3}$ Std. 58°		ca. 5000
5) Milz in NaCl	1200 im Mittel	} 5—6000
6) „ „ „ „ „ „ „ „ $\frac{1}{3}$ Std. 58°		
7) Knochenmark in NaCl		
8) „ „ „ „ „ „ „ „ $\frac{1}{3}$ Std. 58°		
9) Drüse in NaCl		
10) „ „ „ „ „ „ „ „ $\frac{1}{3}$ Std. 58°		1184
		2196

In gleicher Weise unwirksam waren Thymus, Leber, Niere, Hirn. Das Serum des Tieres tötete sämtliche Bacillen ab.

1) Bail, dieses Centralbl. Bd. XXXIII. 1903. No. 5. Soweit eigene Erfahrungen vorliegen, wird das Kaninchenblut, in voller Uebereinstimmung mit Conrad, auch bei weit vorgeschrittener Milzbrandinfektion nicht verändert.

2) Dieses Centralbl. 1903. No. 10.

Läßt man ein Kaninchen aus einer Carotis verbluten, so bleibt stets noch Blut in den Organen in ansehnlicher Menge zurück. Aber auch mit diesem Blutgehalte findet sich keine Wirksamkeit der in Kochsalz-lösung zerriebenen Organe, obwohl die danach erhaltene Flüssigkeit nur ein verdünntes Blut darstellt. Selbst der Zusatz geringer Serummengen ändert nichts.

Tabelle II.

Kaninchen aus der linken Carotis verblutet. Die Organe in sehr schwach peptonhaltiger NaCl-Lösung zerrieben, 1 Stunde bei 37° belassen, abgegossen und je 1 ccm davon teils direkt, teils nach Zusatz von je 0,05 ccm Serum desselben Tieres verwendet.

	Sofort	Nach 4 Std.		
1) 1 ccm pepton. NaCl-Lösung		2000		
2) 1 " " + 0,05 Kaninchenserum		ca. 8000		
3) Milz in 1 ccm pept. NaCl-Lösung				
4) " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.	544 im Mittel	}		
5) Knochenm. " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.			ca. 8000	
6) " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.				
7) Thymus " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.				
8) " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.				
9) Leber " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.			1504	
10) " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.			1496	
11) Niere " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.				
12) " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.				
13) Muskel " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.			ca. 8000	
14) " " " " " " + 0,05 ccm Kan.-S.				
15) 1 ccm Kaninchenserum				0

Die geringe, aber sicher entwicklungshemmende Wirkung, welche in diesem Versuche die Leber zeigt, wurde weiterhin nicht mehr beobachtet.

Das Resultat dieses Versuches wird noch auffälliger, wenn man es mit dem der folgenden Tabelle vergleicht, in welcher die gleichen Organe mit fremdem Serum in analoger Weise behandelt wurden.

Tabelle III.

Die gleichen Organe mit Ochsen- und Schweineserum, die vorher $\frac{1}{2}$ Stunde auf 58° erhitzt waren, behandelt.

	Sofort	Nach 4 Std.		
1) 1 ccm Ochsen Serum $\frac{1}{2}$ Std. 58°		ca. 8000		
2) 1 " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kaninchenser.		0		
3) Milz in 1 ccm Ochsen Ser. $\frac{1}{2}$ St. 58°		14		
4) " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.	544 im Mittel	}		
5) Knochenm. " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			0	
6) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			0	
7) Thymus " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			ca. 8000	
8) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			39	
9) Leber " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			816	
10) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			968	
11) Niere " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			ca. 8000	
12) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			600	
13) Muskel " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			8—10000	
14) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.			ca. 10000	
15) 1 ccm Schweineserum $\frac{1}{2}$ Std. 58°				3
16) 1 " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kaninchenser.				6656
17) Knochenm. in 1 ccm Schweineser. $\frac{1}{2}$ St. 58°				62
18) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.				ca. 10000
19) Thymus " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.		504		
20) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.		3232		
21) Leber " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.		450		
22) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.		ca. 10000		
23) Niere " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.		248		
24) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.				
25) Muskel " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.		ca. 10000		
26) " " " " " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kan.-S.				

Des genaueren kann dieser sowie zahlreiche andere Versuche erst später besprochen werden. Vorläufig diene er nur dazu, festzustellen, daß dieselben Organe, welche fremde Sera aktivieren, das Serum des gleichen Tieres seiner ursprünglichen starken Aktivität berauben; ferner dazu, zu zeigen, daß ein geringer Zusatz von Kaninchenserum wohl die fremden, mit den Organen behandelten Serumarten, nicht aber das eigene, dem gleichen Vorgange ausgesetzte Serum wirksam zu machen vermag.

Es wurden dann noch Kaninchenorgane mit ihrem vollen Blutgehalte untersucht, indem die betreffenden Tiere erstickt wurden. Auch dann waren die Verreibungen mit indifferenter Flüssigkeit gänzlich unwirksam, während fremde Sera ergänzt wurden.

Tabelle IV.

Ersticktes Kaninchen. Die Organe werden teilweise in sehr schwach peptonhaltiger NaCl-Lösung, teilweise in $\frac{1}{2}$ Stunde bei 58° erhitztem Hundeserum zerrieben, 1 Stunde bei 37° gehalten. Die abgossenen Flüssigkeiten wurden verwendet.
(Auszugweise wiedergegebener Versuch.)

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm pepton. NaCl-Lösung		3264
2) 1 " " " + 0,05 ccm Kaninchenserum		4032
3) Milz " in 1 ccm pepton. NaCl-Lösung		} über 5000
4) Leber " 1 " " "		
5) Knochenm. " 1 " " "		
6) Thymus " 1 " " "		
7) 1 ccm Hundeserum $\frac{1}{2}$ St. 58°		
8) 1 " " $\frac{1}{2}$ " 58° + 0,05 ccm Kaninchenserum	2510 im Mittel	
9) Milz " in 1 ccm Hundeserum $\frac{1}{2}$ Std. 58°		2
10) Leber " 1 " " " $\frac{1}{2}$ " 58°		568
11) Knochenm. " 1 " " " $\frac{1}{2}$ " 58°		4600
12) Thymus " 1 " " " $\frac{1}{2}$ " 58°		5
13) 1 ccm Kaninchenserum		8000
		0

Schon aus diesen Versuchen geht mit aller Sicherheit hervor, daß das Kaninchenserum in Verbindung mit Kaninchenorganen, also in Nachahmung der Verhältnisse, die im Tierkörper selbst bestehen müssen, sich ganz anders verhält, wie in dem üblichen Reagenzglasversuche. Von da an war es nur ein kleiner Schritt zum Studium des Einflusses der blutfrei gemachten Organe auf zugesetztes Serum.

Tabelle V.

Leber, Niere, Muskel und Sperma eines mit NaCl-Lösung durchspülten Kaninchens wurden zerrieben, kleine Mengen des betreffenden Organbreies je $2\frac{1}{2}$ ccm Serum des gleichen Tieres (das Serum höchstens 2 Stunden alt) zugesetzt, 1 Stunde bei 37° belassen, dann zum Teil als solche, zum Teil nach Zentrifugieren verwendet. Ein Klarwerden der Flüssigkeit erfolgt dabei, außer bei dem mit Muskeln behandelten Serum, nicht.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm akt. Kaninchenserum.		3
2) 1 " " " m. Leber behandelt		} 4-8000
3) 1 " " " " " u. zentrifug.		
4) 1 " " " " " Niere " u. zentrifug.		
5) 1 " " " " " Muskel " u. zentrifug.		
6) 1 " " " " " " " u. zentrifug.		
7) 1 " " " " " Sperma " u. zentrifug.		
8) 1 " " " " " " " u. zentrifug.		
9) 1 " " " " " " " u. zentrifug.		
	1192 im Mittel	

Tabelle VI.

Anordnung wie in Tabelle V. Nur zentrifugierte Flüssigkeiten verwendet.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Kaninchenser. akt.		0
2) 1 " " " m. Milz behand.		} 8—10 000
3) 1 " " " " " " + 0,05 ccm K.-S. akt.		
4) 1 " " " " " " Leber " "		ca. 6000
5) 1 " " " " " " " + 0,05 ccm K.-S. akt.	914 im Mittel	4192
6) 1 " " " " " " Niere " "		} 8—10 000
7) 1 " " " " " " " + 0,05 ccm K.-S. akt.		
8) 1 " " " " " " Drüse (Pankreas Aselli) behan- delt		6200
9) 1 " " " " " " Drüse (Pankreas Aselli) behan- delt + 0,05 ccm Kan.-S. akt.		ca. 10 000
10) 1 " " " " " " Knochenm. beh.		} ca. 10 000
11) 1 " " " " " " " + 0,05 ccm K.-S. a.		

Alle untersuchten Organe hatten somit das eigene Serum, das sie als Blut noch wenige Stunden vorher gespült hatte, unwirksam gemacht. Es ist sofort hinzuzufügen, daß auch die übrigen Organe diese Eigenschaften teilen. Auf gelegentliche Abweichungen wird später eingegangen werden. Dem Einwande, daß es sich hier um tote Zellen handelt, deren Wirkung eine andere sein könne, als die der lebenden, wird durch die Versuche mit Sperma vorgebeugt, denn wenigstens die Spermatozoen überlebten. Der Einfluß der Zellen auf das Serum ist ein so starker, daß selbst die Leukocyten eines Aleuronatexsudates, also sonst im Serum eines fremden Tieres eine der ergiebigsten Komplementquellen, eine gewisse, mehr oder weniger ausgesprochene Abschwächung der Serumwirkung herbeiführen können¹⁾. Diese sind aber zum weitaus größten Teile lebend.

Tabelle VII.

Zwei Versuche zusammengestellt. Die Leukocyten wurden aus Aleuronatexsudat gewonnen, gewaschen, dem Serum des gleichen Tieres zugesetzt und nach 1 Stunde Aufenthalt bei 37° abzentrifugiert.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Kan.-S.		0
2) 1 " " nach Behandlung mit Leukocyten	} 962	24
3) 1 " " " "		0
4) 1 " " mit Leukocyten	} 1612	66
5) 1 " " " " dann zentrifugiert		47
6) 1 " " 1/2 Std. 58°		0
7) 1 " " 1/2 " 58° mit Leukocyten		1824
8) 1 " " 1/2 " 58° " " dann zentrifugiert		1952

Bedeutend ist somit zwar die Herabsetzung der abtötenden Kraft des Serums nicht, und sie kann bisweilen auch ausbleiben, aber bei der absolut sicheren Wirkung reinen Kaninchenserums ist auch das Ueberleben der vereinzelt Keime nach der Leukocytenbehandlung beweisend.

Die Frage, wie die Aufhebung der Bakterizidie des Serums durch Organzellen zu stande kommt, läßt sich an der Hand geeigneter Versuche leicht beantworten.

1) Derartige Beobachtungen wurden bereits sehr frühzeitig (im Jahre 1899) gemacht. (Vgl. dieses Centralbl. Bd. XXVII. 1900. No. 1. p. 17.)

Tabelle VIII.

Großes Kaninchen verblutet und mit NaCl-Lösung durchspült. Organe und Serum des gleichen Tieres. Dazu frisches Schaf- und Schweineserum.

		Sofort	Nach 4 Std.
1)	1 ccm Kaninchenserum		0
2)	1 " " mit Leber behandelt		6-8000
3)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		7
4)	1 " Schweineserum + 0,05 ccm des mit No. 2 bezeichneten Serums		0
5)	1 " Schafserum + 0,05 " " " 2 " "		6-8000
6)	1 " Kaninchenserum mit Niere behandelt		0
7)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		124
8)	1 " Schweineserum + 0,05 ccm des mit No. 6 bezeichneten Serums		ca. 10 000
9)	1 " Schafserum + 0,05 " " " 6 " "		29
10)	1 " Kaninchenserum mit Milz behandelt		10
11)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		6000
12)	1 " Schweineserum + 0,05 ccm des mit No. 10 bezeichneten Serums		0
13)	1 " Schafserum + 0,05 " " " 10 " "		0
14)	1 " Kaninchenserum mit Knochenmark behandelt		ca. 10 000
15)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kan.-S.		0
16)	1 " Schweineserum + 0,05 ccm des mit No. 14 bezeichneten Serums		0
17)	1 " Schafserum + 0,05 " " " 14 " "		ca. 10 000
18)	1 " Kaninchenserum mit Drüse behandelt		0
19)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		0
20)	1 " Schweineserum + 0,05 ccm des mit No. 18 bezeichneten Serums		2832
21)	1 " Schafserum + 0,05 " " " 18 " "		4240
22)	1 " Kaninchenserum mit Muskel behandelt		0
23)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		ca. 10 000
24)	1 " Schweineserum + 0,05 ccm des mit No. 22 bezeichneten Serums		6272
25)	1 " Kaninchenserum mit Gehirn behandelt		0
26)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		0
27)	1 " Schweineserum + 0,05 ccm des mit No. 25 bezeichneten Serums		0
28)	1 " Schafserum + 0,05 " " " 25 " "		ca. 10 000
29)	1 " Schweineserum		0
30)	1 " " + 0,05 ccm aktiven Kaninchenserums		ca. 10 000
31)	1 " Schafserum		0
32)	1 " " + 0,05 ccm aktiven Kaninchenserums		0

914 im Mittel

Tabelle IX.

Kaninchen verblutet und mit NaCl-Lösung durchspült. Serum des gleichen Tieres und frisches Ochsenserum.

		Sofort	Nach 4 Std.
1)	1 ccm Kaninchenserum		0
2)	1 " Ochsenserum		2384
3)	1 " " + 0,05 ccm aktives Kaninchenserum		0
4)	1 " Kaninchenserum mit Leber behandelt		8-10 000
5)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		1
6)	1 " Ochsenserum + 0,05 ccm des mit No. 4 bezeichneten Serums		ca. 10 000
7)	1 " Kaninchenserum mit Milz behandelt		37
8)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		8-10 000
9)	1 " Ochsenserum + 0,05 ccm des mit No. 7 bezeichneten Serums		0
10)	1 " Kaninchenserum m. Knochenmark beh.		1768
11)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		3248
12)	1 " Ochsenserum + 0,05 ccm des mit No. 10 bezeichneten Serums		0
13)	1 " Kaninchenserum mit Drüse behandelt		8-10 000
14)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		320
15)	1 " Ochsenserum + 0,05 ccm des mit No. 13 bezeichneten Serums		8-10 000
16)	1 " Kaninchenserum mit Niere behandelt		320
17)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		8-10 000
18)	1 " Ochsenserum + 0,05 ccm des mit No. 16 bezeichneten Serums		0
18)	1 " Kaninchenserum mit Nebenniere behand.		2240
20)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		2728
21)	1 " Ochsenserum + 0,05 ccm des mit No. 19 bezeichneten Serums		0
22)	1 " Kaninchenserum mit Thyreoidea behand.		2240
23)	1 " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		2728
24)	1 " Ochsenserum + 0,05 ccm des mit No. 22 bezeichneten Serums		0

1354 im Mittel

Um die Tabellen nicht noch weiter auszudehnen, sei bemerkt, daß die Organverreibungen von Knochenmark und Milz dieser Kaninchen, Ochsen- und Schweineserum stark, die von Leber schwächer bakterizid machten, wie dies bereits öfters angeführt wurde.

Da bei solchen Versuchen eine möglichst genaue quantitative Dosierung des Organbreies notwendig ist, um z. B. Leber in gleicher Menge auf Kaninchen- und Schweineserum wirken zu lassen, so mögen einige Worte, die eingehaltene Technik betreffend, hier Platz finden: Die steril¹⁾ herauspräparierten Organe wurden in Reibschalen möglichst gut zerquetscht und dann durch ein sehr feines Drahtnetz getrieben. Der in einer untergestellten Schale aufgefangene Brei besaß dann in der Regel, namentlich bei Tieren, deren Gefäßsystem vorher mit Kochsalzlösung durchspült worden war, eine solche Konsistenz, daß er in eigens angefertigte Pipetten mit weiter Mündung aufgesaugt und tropfenweise ausgeblasen werden konnte²⁾. Diese Methode erlaubte auch, wenigstens für die Leber, die Menge Zellbreies festzustellen, die zur Aufhebung der bakteriziden Wirkung von 1 ccm Kaninchen Serum genügt.

Tabelle X.

Auf eben beschriebene Weise hergestellter Leberbrei eines mit physiologischer Kochsalzlösung durchspülten Kaninchens wird zu 4, 10 und 20 Tropfen je 2 ccm Serum des gleichen Tieres zugesetzt; die Mischungen (also 2, 5, 10 Tropfen für 1 ccm) $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° gehalten und zentrifugiert.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Kaninchen Serum		0
2) 1 " " mit 2 Tropfen Leberbrei	389 im Mittel	7
3) 1 " " " 5 " "		2088
4) 1 " " " 10 " "		über 5000

Die Menge von Leberzellen, die hier zwischen 2 und 5 Tropfen des Breies liegt und die hinreicht, um 1 ccm Kaninchen Serum unwirksam zu machen, ist also recht gering. Später auszuführende Versuche zeigen, daß auch noch weniger Zellen ausreichen, sobald nur die Einsaat etwas größer als in dem Versuche der Tabelle X genommen wird.

Es ist aber durchaus nicht nötig, daß die Organe so fein zerkleinert werden, wie dies durch die angeführte Technik ermöglicht wird. In früheren Versuchen hatten auch die nur gröblich zerriebenen Organe die gleiche Wirkung entfaltet. Am deutlichsten zeigte sich dies jedesmal bei Verwendung von Muskeln. Diese wirklich zu zerreiben, wäre nur bei Anwendung größerer Mengen von Sand oder dergl. möglich, welche Zusätze nach Tunlichkeit vermieden wurden³⁾. Es wurden daher kleine Faserstücke direkt zugesetzt, so daß die Sera gar nicht getrübt waren; dennoch war die Aufhebung der Bakterizidie eine vollkommene.

(Schluß folgt.)

1) Es wäre Selbsttäuschung, sich vorreden zu wollen, daß all die notwendigen Manipulationen wirklich ganz steril gemacht werden könnten. Aber während der relativ kurzen Versuchszeit störten die etwa aufgetretenen Verunreinigungen in keiner Weise und wurden überhaupt nur selten bemerkt. Wurden die „sterilen“ Organverreibungen allerdings länger aufbewahrt, dann veränderte sich das Bild.

2) Der im Verlaufe der Arbeit publizierte Apparat von Latapie (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1902. No. 12), mit dem sich solche Abmessungen wohl noch genauer ermöglichen lassen werden, stand leider nicht zur Verfügung.

3) Wenn überhaupt steriler Sand angewendet wurde, so geschah dies nur in sehr geringen Mengen und nicht zu dem Zwecke einer besseren Zertrümmerung, sondern nur um das Abgleiten des Pistills von den glatten Organen zu vermeiden.

Contribution à l'étude de l'origine de l'alexine bactéricide.

[Travail de l'Institut de Pathologie et de Bactériologie de l'Université de Liège.]

Par U. Lambotte, Liège.

La question de la présence de l'alexine ou complément dans le plasma sanguin est une des plus importantes de celles qui préoccupent tous ceux qui étudient le problème de l'immunité. Mr. Falloise, de l'Institut de Physiologie de Liège, vient d'apporter une importante contribution à ces recherches ¹⁾, en affirmant que l'alexine hémolytique circule librement dans le sang et serait même plus abondante dans le plasma que dans le sérum. Mr. Falloise a eu l'ingénieuse idée de se servir, pour obtenir le plasma du sang, de la vieille méthode de Frédéricq consistant en l'isolement sur l'animal vivant d'une grosse veine et le prélèvement entre deux ligatures de ce vaisseau gorgé de sang.

J'ai été amené à m'occuper de cette question des rapports du complément avec le plasma sanguin à la suite de recherches entreprises en ce moment à l'Institut bactériologique de Liège sur les alexines bactéricides des sérums normaux, et la question s'est posée, au cours de ces travaux, de savoir si la ou les substances bactéricides de certains sérums normaux sont ou non des substances présentes dans le sang en circulation, dans le plasma. Le travail de Mr. Falloise m'a suggéré l'idée de vérifier si l'alexine bactéricide se comporte comme l'alexine hémolytique quand on se sert de plasma recueilli suivant le procédé de Frédéricq. Mr. Falloise n'a porté ses investigations que sur le complément hémolytique.

Voici comment j'ai procédé :

J'ai opéré sur du plasma recueilli chez trois espèces animales : la poule, le chien et le cheval. L'obtention d'un plasma incoagulable est beaucoup plus facile, on le sait, chez la poule que chez le chien et le cheval.

Chez la poule, en effet, il suffit d'enfoncer dans l'une des carotides une canule paraffinée, après avoir pris soin de cautériser au fer rouge le vaisseau à l'endroit de la piqûre, et de recevoir le sang directement dans des tubes paraffinés et refroidis au moyen de glace, pour empêcher la coagulation immédiate du liquide sanguin. En soumettant ce sang fluide à des centrifugations successives dans des tubes paraffinés et refroidis, chaque centrifugation portant seulement sur la moitié supérieure environ du liquide de la centrifugation antérieure, on finit par obtenir un liquide tout à fait limpide, à peu près complètement dépourvu d'éléments figurés : il faut d'actives recherches et de nombreuses préparations pour y déceler la présence de très rares leucocytes. Un tel plasma est difficilement coagulable, tout au moins tant que la température extérieure n'est pas trop élevée ; à la glacière — environ 4° — notre plasma de poule s'est conservé à l'état fluide pendant plusieurs semaines, pendant un mois et plus.

Pour le chien et le cheval la méthode des tubes paraffinés donne de moins bons résultats ; on réussit difficilement à préparer un plasma

1) Bulletin de l'Académie des Sciences de Belgique. 1903.

incoagulable; presque toujours le sang se coagule au cours des manipulations nécessaires pour l'obtention d'un liquide débarrassé d'éléments figurés. Aussi avons nous eu recours au procédé de Frédéricq.

Une veine de gros calibre, l'une des jugulaires, est mise à nu sur le vivant et isolée sur une certaine étendue, puis enlevée entre deux ligatures. Après deux ou trois heures de suspension dans un endroit frais, à la glacière, les globules sanguins se rassemblent à l'extrémité inférieure du vaisseau, les deux tiers supérieurs étant occupés par le plasma tout à fait liquide et que l'on distingue aisément à travers les parois transparentes de la veine. Une ligature est placée à quelque distance au dessus du niveau supérieur du dépôt, de façon à séparer le plasma. Au bout d'une heure de repos on divise la veine en deux parties par une ligature et l'on plonge, après cautérisation, dans le compartiment supérieur, une pipette paraffinée et refroidie, à l'aide de laquelle on transfère le plasma liquide dans des tubes paraffinés et entourés de glace. Après deux centrifugations successives, le plasma recueilli est à peu près débarrassé de tout élément cellulaire: les recherches doivent porter sur plusieurs préparations pour y rencontrer de rares globules blancs. Ce plasma se prend cependant en gelée, même à la température de la glacière, après quatre ou cinq semaines pour le plasma de cheval, après huit à dix heures pour le plasma de chien; à la température de la chambre, le plasma de cheval reste fluide trois ou quatre jours; celui de chien se coagule beaucoup plus rapidement, après trois quarts d'heure environ.

C'est dans ces différents plasmas excessivement pauvres en cellules que nous avons recherché la présence de l'alexine active sur les microbes.

Nous avons choisi comme critérium de l'action bactéricide la modification immédiatement décelable sous le microscope que subit le vibron cholérique dans certaines conditions au contact des humeurs organiques et qui est connue sous le nom de «phénomène de Pfeiffer». On sait que des vibrions cholériques injectés dans la cavité péritonéale d'un cobaye immunisé contre le choléra, ou mélangés in vitro avec du sérum préalablement chauffé à 55—60° du même animal et additionné d'un peu d'alexine — sérum frais d'un autre animal normal de même espèce ou d'espèce différente — subissent au bout d'un temps relativement court une transformation complète: les vibrions s'agglutinent et presque tous prennent la forme de granules arrondis. La transformation en granule est l'indice de l'action bactéricide qu'exerce sur le vibron le produit en contact. On sait aussi que le phénomène de Pfeiffer se manifeste, mais d'une façon beaucoup moins énergique, en l'absence du sérum spécifique correspondant, c'est à dire quand on fait agir du sérum normal fraîchement recueilli sur des vibrions du choléra non sensibilisés.

Nous avons donc recherché si nos différents plasmas, purgés de cellules, donnaient le phénomène de transformation vibronnienne de Pfeiffer, et comparé le pouvoir bactéricide de chacun de ces liquides à celui du sérum frais appartenant au même animal et recueilli en même temps, sérum qui s'est formé lors de la coagulation du liquide sanguin très riche en cellules.

Le procédé employé a été le suivant: on prend une culture jeune (18 à 24 heures) sur gélose nutritive de vibrions du choléra et on la délaye dans 5 c. c. d'une solution à 9‰ de NaCl dans l'eau. On prélève quelques gouttes de cette émulsion de vibrions auxquelles on mé-

lange une quantité moitié moindre de sérum, au préalable chauffé pendant une demie heure à 55°, d'une cobaye vacciné contre le choléra par plusieurs injections intrapéritonéales. Après quelques minutes de contact, en fait agir sur les vibrions ainsi sensibilisés, du plasma ou du sérum de poule, de chien ou de cheval, dans des préparations en gouttes pendantes: on dépose sur des lamelles au moyen d'une anse de platine une gouttelette d'émulsion de bacilles sensibilisés; on ajoute, au moyen de la même anse, dans certaines préparations une gouttelette de plasma, dans d'autres une gouttelette du sérum frais, dans d'autres enfin une gouttelette d'eau salée. On retourne alors chaque lamelle sur une lame à cupule, les bords de celle-ci étant enduits de vaseline. Les différentes préparations sont alors placées à 37°. Après des temps qui varient entre une demie-heure et deux heures, on prélève un certain nombre de lamelles de chaque espèce et l'on fait avec les gouttes suspendues des préparations colorées, par application directe de chaque lamelle sur une lame porte-objet préalablement teintée au bleu de méthylène en solution aqueuse, et desséchée ensuite. Les vibrions du choléra, transformés ou non en granules, se colorent par ce procédé en bleu plus ou moins foncé.

Disons de suite que dans tous nos essais nos différents plasmas ne se sont pas comportés autrement que les sérums correspondants.

Ainsi, déjà après trois quarts d'heure à 37° on constate que la transformation en granules des vibrions commence à se manifester aussi bien dans les préparations à plasma de chien et de cheval que dans les préparations à sérum des mêmes animaux. Après une heure et demie de contact le phénomène de Pfeiffer est complet et des plus nets dans toutes les préparations: la presque totalité des microbes se présente sous forme de grosses granulations agglutinées et colorées en bleu plus ou moins intense; quelques vibrions moins altérés présentent la forme normale, mais sont manifestement plus volumineux. Les préparations à plasma ne se distinguent en rien des préparations à sérum: la proportion des vibrions modifiés et celle des bacilles plus ou moins intacts est la même dans l'une et l'autre espèce de préparations. La seule différence à signaler consiste en ce que dans les préparations à plasma les granules prennent moins énergiquement la couleur, apparaissent teintés en bleu plus pâle, ce qui, selon l'interprétation de Bordet, serait le fait d'une action bactéricide plus intense de la part du plasma.

Dans les préparations témoins, au contraire, celles dans lesquelles le liquide organique, plasma ou sérum, a été remplacé par de l'eau salée, les microbes restent parfaitement intacts, même après deux heures, et se colorent énergiquement par le bleu de méthylène.

Avec les produits de la poule les résultats obtenus sont identiques. La transformation en granules est seulement un peu plus lent à se produire; il faut une heure de contact pour voir apparaître les premières granulations; mais après deux heures, le phénomène de Pfeiffer est complet. Et ici encore, comme pour le chien et le cheval, l'action bactéricide est tout aussi intense, qu'il s'agisse du plasma ou du sérum, et apparaît simultanément dans les deux espèces de préparations.

Une particularité intéressante de ce plasma de poule, que nous n'avons pu malheureusement rechercher dans le sérum, consiste dans la longue persistance du pouvoir vibrionicide: du plasma de poule vieux de 21 jours s'est encore montré doué d'une certaine activité vis à vis des vibrions sensibilisés. La transformation se faisait bien, mais moins

rapidement et d'une façon moins intense que dans les préparations à plasma neuf.

En même temps que la mise en évidence dans nos plasmas de l'alexine bactéricide, nous avons répété avec ces liquides les expériences de Mr. Falloise sur les hématies. Nous avons pu observer, comme cet auteur l'a montré, que les plasmas de poule, de chien et de cheval exercent sur les globules rouges du lapin sensibilisés par un sérum spécifique correspondant une action hémolytique au moins aussi intense et aussi rapide que les sérums frais de ces mêmes animaux.

Dans nos préparations en gouttes pendantes, le plasma, sous l'influence de la température relativement élevée de 37° nécessaire à la production du phénomène de Pfeiffer, ne tarde pas à se coaguler: les gouttes deviennent troubles, gélatineuses. On pouvait penser que le pouvoir alexique n'apparaissait dans nos préparations qu'après la coagulation du plasma. Mais alors, il faut que le sérum contienne une plus forte proportion de complément que le plasma correspondant, en d'autres termes que le sérum soit plus manifestement bactéricide. En effet, si pendant la vie les substances bactéricides siègent uniquement dans certains leucocytes et ne diffusent qu'au moment où le sang subit le phénomène de la coagulation, une différence nette doit apparaître entre le pouvoir alexique du sérum, provenant de la coagulation du liquide sanguin riche en leucocytes, et le produit de la coagulation du plasma, liquide excessivement pauvre en cellules.

Aussi nous sommes nous demandé si la teneur de nos plasmas en matière bactéricide était comparable à celle des sérums frais provenant des mêmes animaux et recueillis en même temps, lors de la prise du sang nécessaire pour la préparation des plasmas.

Pour élucider ce point nous avons étudié comparativement l'action en gouttes pendantes de nos plasmas et de nos sérums soumis à des dilutions de plus en plus fortes dans l'eau physiologique, non seulement sur des vibrions du choléra sensibilisés, mais également sur des vibrions normaux, n'ayant pas subi l'influence de l'immun-sérum. Un tel serum ayant pour effet de favoriser l'action du complément au point de ne rendre nécessaire pour l'obtention du phénomène de Pfeiffer que des traces de la substance bactéricide, il est bien évident que l'emploi de microbes tout à fait normaux sera plus apte à déceler des différences dans la teneur en alexine de deux liquides.

Les expériences faites dans ce but montrent qu'il faut diluer notre plasma de cheval à 1 p. 25 pour ne plus obtenir qu'une très légère transformation en granules des vibrions du choléra sensibilisés par l'immun-sérum. Après deux et même trois heures de contact à 37° le plasma de cheval ainsi dilué devient à peu près inactif; les préparations ne montrent plus que de rares granules; les microbes en général ne paraissent nullement altérés et prennent énergiquement la couleur. Le plasma plus fortement dilué encore devient tout à fait inefficace, quelle que soit la durée du contact. Au contraire à des dilutions moindres le phénomène de Pfeiffer apparaît et se manifeste avec d'autant plus de netteté et de rapidité que le plasma est moins dilué. Ainsi dans les préparations où la dilution est à 1 p. 10 le phénomène débute au bout d'une heure de séjour à 37°; après deux heures la transformation porte sur la moitié environ des vibrions, l'autre moitié présentant manifestement des signes d'altération caractérisés notamment par une augmentation d'épaisseur.

Le sérum de cheval donne aux mêmes dilutions des résultats absolument comparables. Dilué au $\frac{1}{10}$ il ne se montre actif qu'après une heure de contact, et il lui faut deux heures pour arriver à faire subir complètement à la moitié environ des vibrions sensibilisés le phénomène de Pfeiffer. De même son action devient nulle quand on dépasse la dilution de 1 p. 25; à cette dernière dilution le nombre des granules est des plus restreints; à côté d'un grand nombre de vibrions intacts, quelques individus ont fini par se transformer après deux heures en grosses granulations qui se colorent facilement.

L'analogie d'action du sérum et du plasma d'un même animal apparaît encore plus probante dans les essais pratiqués sur les vibrions normaux. Ici, en l'absence de l'influence favorisante de l'immun-sérum, la quantité de complément nécessaire pour le phénomène de Pfeiffer devient plus considérable et par suite il sera plus facile de trancher d'une manière suffisamment démonstrative la question que nous nous sommes posée, à savoir si nos plasmas sont aussi riches en complément que les sérums correspondants.

Le sérum bien frais de cheval ou de chien réalise in vitro d'une manière appréciable la transformation granulaire des vibrions normaux: le phénomène commence à devenir très net au bout d'une heure à 37° et après deux heures il est complet. Mais dilué seulement de moitié à l'aide d'eau physiologique il perd beaucoup de son activité: la transformation devient non seulement moins intense mais est de plus fort ralentie; il faut une heure et demie pour voir apparaître quelques rares granules et après deux heures les vibrions ne sont qu'en partie transformés. Enfin à des dilutions de 1 p. 2, 1 p. 3, 1 p. 4, l'action devient de moins en moins intense et à 1 p. 5 le sérum de cheval ou de chien, à force d'être dilué, ne réalise plus le phénomène de Pfeiffer après deux heures de contact à 37°.

Le plasma de ces mêmes animaux étudié dans les mêmes conditions donne des résultats absolument parallèles. Non dilué, son action sur les vibrions est au moins aussi manifeste que celle du sérum; après deux heures, presque tous les vibrions sont en granules. L'addition de liquide physiologique exerce sur lui le même effet affaiblissant, et pour une dilution déterminée il est impossible de saisir une différence entre les préparations à plasma et les préparations à sérum, que l'on envisage le temps nécessaire à l'apparition du phénomène ou la proportion des vibrions altérés.

Ajoutons que pour la poule les faits observés sont identiques: le plasma considéré dans son action sur les microbes du choléra non sensibilisés se comporte absolument comme le sérum.

Il n'y a donc pas entre nos plasmas séparés des leucocytes avant toute destruction de ceux-ci et les sérums provenant de la coagulation du sang complet, de différence manifeste au point de vue bactériolytique dans la teneur de ces liquides en complément.

L'alexine bactéricide, comme l'alexine hémolytique, ainsi que l'a montré Mr. Falloise, si elle provient de certains éléments figurés du sang, doit pouvoir diffuser de ces éléments dans le liquide environnant avant la coagulation, c'est à dire avant la destruction des globules blancs.

Liège, 1903.

Nachdruck verboten.

Zur Theorie der natürlichen antibakteriellen Immunität.

[Aus dem hygienischen Institute der Universität Graz.]

Von Dr. Paul Theodor Müller,
Assistent am hygienischen Institute Graz.

Die Tatsache, daß ungünstige Lebensbedingungen wie mangelhafte Ernährung, übermäßige Anstrengung, ungesunde, unreinliche Wohnungen, psychische Schädlichkeiten, Kummer und Sorgen u. s. w. die Disposition des Menschen für gewisse Infektionskrankheiten wesentlich zu erhöhen im stande sind, ist eine so allgemein bekannte und selbst der oberflächlichsten Beobachtung sich aufdrängende, daß man seit langem daran ging, dieselbe auch experimentell, im Tierversuch, zu studieren und ihre Ursachen zu erforschen. Während es sich nun aber bei diesen am Menschen gemachten Beobachtungen fast niemals um die Aufhebung einer wirklichen Immunität gegenüber den betreffenden Krankheitserregern handelte, sondern immer nur um eine mehr oder minder hochgradige Steigerung einer auch im vollkommen normalen Zustande und unter günstigsten Lebensbedingungen bestehenden Disposition, hat man sich im Tierversuche, wo man möglichst greifbare und krasse Resultate anstrebt, geradezu bemüht, durch verschiedene im obigen Sinne einwirkende Schädlichkeiten die normaliter bestehende natürliche Immunität der Tiere zu brechen und dieselben so für Infektionserreger empfänglich zu machen, denen sie unter gewöhnlichen Verhältnissen nicht unterliegen¹⁾. Es ist nicht unsere Absicht, hier eine vollständige Uebersicht über die diesbezügliche, bereits recht umfangreiche Literatur zu geben. Insbesondere möchten wir von vornherein davon absehen, alle jene Experimente in den Kreis unserer Betrachtungen einzubeziehen, bei welchen der Verlust der Immunität durch Einführung von Giften, Durchschneidung wichtiger Nervenstämme und andere derartige direkte Eingriffe in den Chemismus oder Mechanismus des betreffenden Tierleibes bewirkt wurde, welche an und für sich schon geeignet sind, eine deutliche Erkrankung hervorzubringen. Aber auch bei den übrigen, weniger eingehenden und eingreifenden Methoden, die Widerstandsfähigkeit der Versuchstiere herabzusetzen, wollen wir uns lediglich auf die Angabe der wichtigsten Versuchsergebnisse beschränken.

Vor allem verdienen hier die bekannten Versuche von Canalis und Morpurgo (1) erwähnt zu werden, welche zeigen konnten, daß Tauben konstant ihre Immunität gegen Milzbrand verlieren, wenn man sie hungern läßt. Dieselbe Wirkung hatte partielle oder totale Exstirpation des Pankreas. Dauerte die Hungerperiode länger als 8—9 Tage, so waren die Tauben auch durch Nahrungszufuhr nicht mehr gegen den Milzbrandbacillus zu schützen. Viel geringer war der Einfluß des Hungerns beim Huhne. Hier gelang es nie, tödlichen Milzbrand hervorzurufen, wenn den Tieren erst vom Momente der Impfung ab die Nahrung entzogen wurde, dieselben starben erst dann, wenn sie 3—7 Tage vor der Infektion gehungert hatten; weiße Ratten waren durch Hungernlassen überhaupt nicht gegen Milzbrand empfänglich zu machen. Bakunin

1) Wir sprechen hier wie im folgenden stets von der antibakteriellen und nicht von der antitoxischen Immunität.

und Boccardi (2) bestätigten diese Befunde der genannten beiden Autoren, soweit sie das Verhalten der Tauben betrafen und fügten die weitere Tatsache hinzu, daß Blutentziehungen bei diesen Tieren nicht im stande seien, die Widerstandsfähigkeit gegen Milzbrand aufzuheben. Ebensovienig wird nach Versuchen Sanquiricos (3) beim Hunde durch wiederholte Aderlässe eine Disposition für den *Bacillus anthracis* geschaffen. Hingegen konnte Platania (4) sowohl Hunde wie Tauben durch Chloralysieren für diesen Mikroorganismus empfänglich machen. Ebenso hatten Pernice und Alessi (5) positive Resultate aufzuweisen, indem es ihnen gelang, durch Wasserentziehung, d. i. durch Durstenlassen, sowohl Hunden als Tauben und Hühnern ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Milzbrandbacillus zu nehmen. Allerdings waren die Versuche mit den Hunden insofern nicht ganz einwandfrei, als diese Tiere, wenn ihnen des Wasser entzogen wird, auch keine Nahrung mehr zu sich nehmen und daher eine sehr bedeutende Kräfteabnahme erleiden.

Charrin und Roger (6) ließen Ratten in einer Tretmühle bis zur hochgradigen Ermüdung laufen und zeigten, daß sie in diesem Zustande erfolgreich mit Milzbrand infiziert werden konnten. Gibier (7) machte die interessante Beobachtung, daß Frösche bei 37° C ihre natürliche Immunität einbüßen und leicht am Milzbrand zu Grunde gehen, und Dieudonné (8) und andere Forscher (Petruschky, Lubarsch, Fahrenholz, Trapeznikoff) konnten diese Tatsache bestätigen. Umgekehrt konnte Ernst (9) Frösche, welche bei niedrigen Temperaturen unfehlbar einer Infektion mit dem von diesem Forscher zuerst beschriebenen *Bacillus ranicida* erliegen, dadurch gegen denselben immun machen, daß er die Tiere in einen auf 25° C eingestellten Brutschrank brachte.

Pasteur und Joubert (10) und später Wagner (11) haben Hühner durch Temperaturerniedrigung — Eintauchen in Wasser von 25° C — für Milzbrand empfänglich gemacht, Sawtschenko (12) hat denselben Effekt bei Tauben durch Durchtrennung des unteren Hals-teiles des Rückenmarks erzielt, womit eine Temperaturerniedrigung von 1—2° C einhergeht. Lipari (13) hat gefunden, daß vorübergehend abgekühlte Tiere der Infektion mit Pneumokokken leichter erliegen als normale Kontrolltiere, und Fischl (14) ist unter Anwendung einer etwas anderen Methodik zu demselben Resultate gekommen. Endlich hat Lode (15) in seinen umfangreichen Studien über die Beeinflussung der individuellen Disposition zu Infektionskrankheiten durch Wärmeentziehung den Nachweis erbringen können, daß in der Tat die Empfänglichkeit für eine ganze Reihe von infektiösen Erkrankungen durch eine dauernde oder vorübergehende Abkühlung wesentlich erhöht werden kann. Eine Reihe anderer Autoren hat ähnliche Wirkungen durch Einverleibung der verschiedensten giftigen Substanzen, besonders von Blutgiften, erzielt, worauf wir jedoch, wie gesagt, nicht näher eingehen wollen.

Fragen wir uns nun, welche Vorstellung man sich heute von dem Wesen der natürlichen antibakteriellen Immunität zu machen hat, so treten uns hier dieselben miteinander im Streite liegenden Hypothesen entgegen, welche sich auch auf dem Gebiete der erworbenen künstlichen oder natürlichen Immunität seit Beginn der bakteriologischen Aera befanden. Nach der einen, die als Phagocytentheorie Metschnikoffs bekannt ist und die erst kürzlich wieder eine erschöpfende Darstellung

von seiten dieses Forschers erfahren hat, unterscheidet sich der für eine bakterielle Erkrankung disponierte Organismus von dem resistenten durch die geringere Lebhaftigkeit oder das vollkommene Ausbleiben der phagocytären Reaktion. Die gegnerischen Theorien dagegen erklären die Resistenz entweder durch die Anwesenheit bakterizider Substanzen in den Körpersäften, oder — eine Anschauung, die besonders von Baumgarten¹⁾ und seiner Schule vertreten wird — durch eine mangelnde Eignung der Säfte und Gewebe, für die betreffenden Mikroorganismen als Nährboden zu dienen.

Wie man sieht, ist die erstere dieser Theorien, die Phagocytentheorie, im wesentlichen eine dynamische: das Eindringen der Infektionserreger in den Organismus ist bei resistenten Tieren nach dieser Auffassung von einer lebhaften cellulären Reaktion gefolgt: Phagocyten wandern aus, begeben sich an den Ort der Invasion, suchen die Mikroorganismen mit ihren Pseudopodien zu erfassen und in sich aufzunehmen, worauf die Eindringlinge den zerstörenden und verdauenden Kräften des Protoplasmas unterworfen werden und zu Grunde gehen. Das endliche Resultat dieses Vorganges, das man in sehr anschaulicher Weise als einen Kampf zwischen Leukocyten und Bakterien dargestellt hat, ist von dem Verhältnis der invasiven Kräfte der eingedrungenen Bakterien einerseits und der reaktiven Kräfte des befallenen Organismus andererseits abhängig.

Dagegen besteht nach den erwähnten beiden anderen Theorien im Falle der Resistenz entweder eine ungünstige Beschaffenheit der Gewebssäfte, welche die Entwicklung der eingedrungenen Krankheitserreger nicht gestattet und dieselben Hungers sterben läßt, oder es wirken die Körperflüssigkeiten direkt schädigend, abtötend, bakterizid, in ähnlicher Weise, wie wir dies bei den zahllosen chemischen Desinfektionsmitteln zu beobachten in der Lage sind. Der lebende Organismus als solcher ist nach diesen Theorien bei der Abtötung der Bakterien gar nicht aktiv beteiligt; die Theorien sind mit anderen Worten — im Gegensatz zur Metschnikoff'schen — keine dynamischen, sondern statische, ein Unterschied, auf den bereits Drago²⁾ aufmerksam gemacht hat. Eine entgültige Entscheidung zwischen diesen beiden sich entgegenstehenden Auffassungen ist bekanntlich bis zum heutigen Tage nicht erfolgt und dieselben werden in den verschiedenen feindlichen Lagern noch immer, wenn auch bereits mit verminderter Energie und Heftigkeit, verfochten. Es liegt uns hier vollkommen fern, in dieser strittigen Frage, auf die vielleicht eine vollkommen einheitliche Antwort gar nicht gegeben werden kann, für die eine oder andere Seite Partei zu ergreifen. Soviel kann aber keinem Zweifel unterliegen, daß die Phagocytentheorie in einem Punkte einen wesentlichen Vorsprung vor ihren Gegnerinnen voraus hat, darin nämlich, daß sie, wie eben auseinandergesetzt, eine dynamische Theorie darstellt. Denn ganz allgemein und nicht nur auf biologischem Gebiete wohnt den dynamischen Theorien eine bei

1) Baumgarten schreibt z. B. Berl. klin. Wochenschr. 1899. No. 41 hierüber: „Gemäß dieser Auffassung hängt die natürliche Immunität einzelner Species, Rassen oder Individuen gegenüber bestimmten Infektionskeimen wesentlich davon ab, daß die betreffenden Species etc. nicht die für ihr Leben und ihre Entwicklung notwendige chemische Zusammensetzung finden.“

2) Drago, Rif. med. p. 175—177, zitiert nach Baumgartens Jahresber. 1898.

weitem größere überzeugende und auch heuristische Kraft inne als den statischen.

Es schien mir daher nicht ohne Berechtigung, die Frage aufzuwerfen, ob nicht auch für die humorale Erklärungsweise der Resistenz, welche die bakterienfeindliche Beschaffenheit der Körpersäfte in den Vordergrund der Betrachtung stellt, dynamische Vorstellungen entwickelt werden könnten, und ob sich auf Grund derselben nicht neue Fragestellungen für das experimentelle Studium dieses Erscheinungsgebietes ergeben würden.

Nun ist allerdings durch die Erkenntnis, daß die Alexine in nahen Beziehungen zu den Leukocyten stehen und entweder von denselben *intra vitam* aktiv sezerniert oder wenigstens nach deren Tode frei werden, eine gewisse Annäherung der beiden sich bekämpfenden Theorien erfolgt und damit zweifellos eine mehr dynamische Auffassung auch im humoralen Sinne angebahnt worden, insofern, als man unter dem Einfluß einer erfolgten Infektion eine leukocytäre Reaktion eintreten ließ, welche aber zur Vernichtung der Krankheitserreger nicht durch Phagocytose, sondern durch gesteigerte Alexinproduktion führen sollte¹⁾. Es schien mir jedoch, als ob die Entwicklung der Immunitätslehre in den letzten Jahren und besonders die von Ehrlich und seiner Schule ausgegangenen Aufklärungen über die Analogie der wirksamen Stoffe der normalen und der Immunsera noch in anderer Weise Mittel zu einer dynamischen Ausgestaltung der humoralen Theorie der natürlichen Immunität an die Hand geben würde, und zwar auf Grund folgender Ueberlegungen.

Wie die vielfache und immer wieder bestätigte Erfahrung gelehrt hat, ist die Einverleibung bakterieller Substanzen in den tierischen Organismus meist von der Entstehung spezifischer Antikörper gefolgt, welche sich besonders leicht im Blutserum, aber auch in den Organen und Gewebssäften nachweisen lassen und welche zum Teil den ausgesprochenen Charakter von Schutzstoffen besitzen, zum Teil allerdings einer solchen Bedeutung *sensu strictiori* zu entbehren scheinen. Jedenfalls stellen diese Antikörper das Produkt einer energischen Reaktion gewisser Körperzellen — welcher, mag unentschieden bleiben — auf die eingeführten mehr oder minder schädlich wirkenden Substanzen dar. Die Zeit, innerhalb welcher das Auftreten derartiger Antikörper im Blutserum zu beobachten ist, schwankt innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Unter günstigen Umständen und bei Einverleibung genügend großer

1) So schreibt z. B. Kruse in Flüggés „Die Mikroorganismen“, 1896. p. 406: „Früher hat man ausschließlich die bakteriziden Eigenschaften der Säfte dafür verantwortlich machen wollen, neuerdings wurde die Mitwirkung der Leukocyten an dem Kampfe gut beglaubigt, aber wohl gemerkt nur in dem Sinne, daß der Wert der Leukocyten wesentlich in ihren Sekretionen, nicht in ihrer Freistätigkeit besteht. Die ersteren kommen viel schneller zur Wirkung als die letztere.“ p. 403: „Es werden also aus den Leukocyten den Alexinen ähnliche Substanzen frei, welche den erhöhten Effekt bedingen.“ „Die Beteiligung der Leukocyten an der Alexinbildung wird durch diese Experimente zwar wieder bewiesen, aber die Herkunft aus anderen Quellen noch nicht ausgeschlossen.“ Kruse spricht ferner auf Grund der bekannten Versuche von Denys und Kaisin die Ansicht aus, daß die bakteriziden Substanzen unter Umständen erst im Momente der Infektion in den Säften erscheinen, was offenbar als eine heilsame Reaktion des Organismus auf eine Bakterieninvasion aufzufassen sei; leider haben die eingehenden Untersuchungen Conradis die diesen Anschauungen zu Grunde liegenden Experimente der beiden belgischen Forscher nicht bestätigen können. Aus seinen Versuchen geht vielmehr, in Uebereinstimmung mit Lubarsch und Bail, hervor, „daß die Annahme von Denys und Kaisin, als ob der Hund bei der Milzbrandinfektion einen Zuwachs seiner bakteriziden Kräfte erhalte, der einwandsfreien Begründung entbehrt“.

Mengen geeigneter Bakterienarten sind dieselben jedoch oft schon nach 1—3 Tagen deutlich nachzuweisen. Um ein konkretes, allerdings ausnahmsweise günstiges Resultat anzuführen, so haben Pfeiffer und Marx (16) in ihren bekannten Untersuchungen über die Bildungsstätte der Choleraszutstoffe mitgeteilt, „daß in einem Versuche (No. 12) schon nach Ablauf von 24 Stunden, genauer nach 41 Stunden, Werte des Serums gefunden wurden, welche über den Titre des normalen Kaninchen-serums entschieden hinausgehen“. Die Injektion der Choleravibrien bei diesen Versuchen geschah subkutan.

Erwägt man nun, daß erstens eine gewisse, jedenfalls nicht ganz unbeträchtliche Zeit vergehen muß, ehe die (zum Teil schwer löslichen und diffusiblen) Zellbestandteile der Bakterienleiber von der lokalen Infektionsstelle an den Ort der hauptsächlichsten Antikörperproduktion (Milz, Knochenmark etc.) gelangen; erwägt man weiter, daß die Anwesenheit der Antikörper im Blute erst dann nachweisbar werden kann, wenn eine genügend große Menge derselben aus den Organen ihrer Entstehung ausgespült und in die Säfte übergeführt wurde — welcher Prozeß durchaus nicht gleichen Schritt mit der Bildung dieser Substanzen zu halten braucht —, so kommt man notwendigerweise zu dem Schlusse, daß der Zeitraum, der zwischen dem ersten Eintreffen der bakteriellen Substanzen in den betreffenden Organen, und zwischen dem ersten Auftreten der Antikörper (welche hierbei noch nicht in solcher Menge vorhanden zu sein brauchen, daß sie mit unseren relativ unempfindlichen Methoden nachzuweisen wären) liegt, ein noch bei weitem kürzerer sein muß, als es nach den eben zitierten Experimenten der Fall zu sein scheint.

Wie groß übrigens die zeitlichen Differenzen zwischen Auftreten der Schutzstoffe im Blute und in den betreffenden Organen sein können, geht wieder aus den Befunden von Pfeiffer und Marx hervor, nach welchen „mindestens in 2 unter 3 Versuchen schon im Laufe des zweiten Tages nach der Präventivimpfung in der Milz deutlich nachweisbare Mengen von Choleraszutstoffen vorhanden sind“, während bei 2 Versuchen die spezifischen Veränderungen im Blute erst vom 3. Tage (3×24 Stunden nach der Injektion) ab nachweisbar waren¹⁾. Im selben Sinne wie die geschilderten Verhältnisse muß übrigens noch der Umstand verzögernd auf die Nachweisbarkeit der schon gebildeten Antikörper einwirken, daß die in den betreffenden Organen abgelagerten und die celluläre Reaktion auslösenden bakteriellen Substanzen meist die Fähigkeit besitzen, sehr bedeutende Mengen der Antikörper zu binden und sofort nach ihrer Entstehung an sich zu reißen; erst von dem Moment ab, wo diese Substanzen abgesättigt sind, kann demgemäß die Produktion der Immunkörper in die Erscheinung treten. Man wird daher wohl mit Recht die Behauptung aufstellen dürfen, daß die Antikörperproduktion kein Vorgang ist, der etwa lange Zeit zu seiner Vorbereitung und Einleitung bedürfte, sondern man wird annehmen können, daß dieselbe schon sehr bald einsetzt, nachdem die betreffenden Organzellen mit den bakteriellen Substanzen in Berührung getreten sind.

1) Analog fand van Embden bei seinen Versuchen über den Entstehungsort der Agglutinine 24 Stunden nach der Inokulation den Agglutininhalt der Milz noch gering; 2 Tage nach der Injektion hingegen war die agglutinierende Substanz in der Milz in weit größerer Konzentration vorhanden als in den übrigen Organen und im Blute. (Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde. Bd. II. 1898. Nach dem Referat in Malys Jahresber. 1898.)

Daß diese Anschauung zutreffend ist, geht auch aus verschiedenen anderen experimentellen Tatsachen mit großer Wahrscheinlichkeit hervor. So vor allem aus der von Loeffler und Abel (17) festgestellten Möglichkeit, Meerschweinchen durch ein geeignetes Verfahren, das später durch Kollmann (18) eine weitere Ausbildung erfuhr, innerhalb ganz kurzer Zeit, d. i. innerhalb weniger Stunden, gegen hohe Dosen virulenter Bacillen unempfindlich zu machen. Denn wenn auch hierbei ein Nachweis von neugebildeten Antikörpern im Blute oder in den Geweben nicht besonders versucht worden zu sein scheint, so kann es doch wohl kaum einem Zweifel unterliegen, daß hier deren Produktion ganz außerordentlich rasch vor sich gegangen sein muß und es liegt kein Grund vor, die so erzeugte Immunität prinzipiell von der gewöhnlichen, erst nach längerer Zeit eintretenden Form abzutrennen, zumal auch in der Dauer derselben kein wesentlicher Unterschied besteht und die in so kurzer Zeit erzielte Widerstandsfähigkeit noch nach Monaten erhalten bleibt. Den einzigen Unterschied wird man also wohl nur darin sehen dürfen, daß bei dem Verfahren der Schnellimmunisierung größere Zellterritorien zu einer intensiveren reaktiven Tätigkeit angespornt werden als gewöhnlich.

Noch eine andere Beobachtung spricht sehr entschieden für die große Schnelligkeit, mit welcher die Antikörperproduktion der Infektion nachfolgt. Bail (19) hat nämlich gezeigt, daß virulente Typhusbacillen, die ins Peritoneum eines Meerschweinchens eingespritzt werden, binnen durchschnittlich 3 Stunden eine charakteristische Veränderung erleiden, indem sie ihre Fähigkeit einbüßen, durch spezifisches Typhusserum agglutiniert zu werden. Diese merkwürdige Erscheinung ist nach den Untersuchungen Bails darauf zurückzuführen, daß Vorstufen der Agglutinine (Agglutinophore), die in dieser ersten Zeit nach Einverleibung der Bacillen reichlich sezerniert werden, die Rezeptoren der Typhusbacillen in Beschlag nehmen und so deren Beeinflussung durch die fertigen Agglutinine des zugesetzten Immunserums verhindern. Auch hier haben wir also eine Tatsache zu verzeichnen, welche, und zwar noch eindringlicher als die früher zitierten, zu beweisen scheint, daß die Entstehung und Abstoßung der spezifischen Reaktionsprodukte der Körperzellen sich zeitlich eng an die gesetzte Läsion anschließt. Auch Bail spricht sich in diesem Sinne aus: „Es müssen also während der ersten 3 Stunden die Typhusbakterien unter dem Einflusse einer Körperreaktion gestanden haben, welche dann das Ausbleiben der Agglutination zur Folge hat.“

(Fortsetzung folgt.)

Nachdruck verboten.

Beitrag zur bakteriologischen Erforschung des Gelbfiebers.

Eine neue Methode für den raschen Nachweis
des *Bacillus icteroides* Sanarelli.

[Aus dem staatlichen Institut für Bakteriologie in S. Paulo, Brasilien.]

Von Dr. Ivo Bandi.

Die außerordentlich großen, zuweilen sogar unüberwindlichen Schwierigkeiten, welche bei den sowohl *intra vitam* als *post mortem* angestellten Nachweisversuchen des *Bacillus icteroides* im Körper

der mit Gelbfieber behafteten Personen aufzutreten pflegen, hängen wesentlich davon ab, daß derselbe im Menschenorganismus sich sehr langsam vermehrt und ferner, daß er sich der antagonistischen Symbiose — welcher er ausgesetzt ist — mit den Keimen der sekundären, am häufigsten von dem Darne ausgehenden Infektion schlecht anpaßt, so daß die letzteren ihn beinahe vollständig überwältigen.

Während die gegenwärtig geübten Isolierungsmethoden hinreichend sind, um das Vorhandensein des *Bacillus icteroides* im Blute der betreffenden Patienten — wo er auch in Reinkultur oder vermischt mit manchen verschiedenen Bakterien vorkommen kann — erweisen sich jedoch solche Verfahren als absolut mangelhaft, wenn es sich darum handelt, den *Bacillus icteroides* aus den Organen, resp. aus dem Blute der betreffenden gestorbenen Patienten zu isolieren; diese Schwierigkeit wird natürlich um so beträchtlicher, je länger die vom Absterben des betreffenden Kranken bis zur Obduktion verflossene Zeit war.

Aus den ebenerwähnten Gründen und da ich die günstige Gelegenheit hatte, bakteriologische Untersuchungen in der Isolierungsabteilung des Krankenhauses für Infektionskrankheiten in S. Paulo (Brasilien) in zwei Gelbfieberfällen auszuführen, richtete ich meine Forschungen auf die Lösung der in Rede stehenden Frage. — Einer der betreffenden Kranken war kaum vor einigen Stunden ins Spital aufgenommen worden.

Als ich die bakteriologischen Untersuchungen anstellte, konnte ich nach den Angaben des Patienten, sowie nach dem charakteristischen Krankheitsbild feststellen, daß es sich hier um die Anfangsstufe des zweiten Krankheitsstadiums handelte, es war zweifelsohne ein Fall gutartiger Natur. — Temperatur 36,8° C, Puls 96.

Die ikterische Verfärbung der äußeren Haut war keine beträchtliche, stärker jedoch war sie an der Bindehaut. Häufiges Erbrechen, aber stets mit einem biliösen Inhalt; es waren ferner Zahnfleischblutungen und Epistaxis vorhanden.

Der nur an Menge herabgesetzte Harn war nicht eiweißreich, vielmehr ergab sich aus der Beschaffenheit desselben eine noch nicht vollständige Niereninsuffizienz. Außer der für das Gelbfieber besonders charakteristischen Unruhe und Angst war das Sensorium nicht bedeutend in Mitleidenschaft gezogen.

Ich entnahm nun aus einer der *Venae medianae* des rechten Arms und unter strengster Asepsis 20 ccm Blut, mit welchem ich 15 Schrägkulturen in Agar-Agar anfertigte, die ich alsdann in den Thermostaten bei einer Temperatur von 37° C setzte.

Am darauffolgenden Tage, d. h. 16 Stunden nachher, konnte ich in drei der eingepflichten Röhrchen mehrere kleine, weiße, glänzende und mit regelmäßigen Rändern versehene Kolonien wahrnehmen.

Diese (fünf) Kolonien, welche ich zu einer weiter unten zu schildernden Untersuchungsreihe benutzte, bestanden aus dem typischen *Bacillus icteroides* Sanarelli.

Im zweiten Falle handelte es sich um den Leichnam eines an Gelbfieber gestorbenen Patienten.

Die bei der Obduktion wahrgenommenen anatomischen Veränderungen berechtigten mich zu der Annahme, daß der in Betracht gezogene Fall eine subakute Form des Gelbfiebers darstellte. — Bald nach Beginn der betreffenden bakteriologischen Untersuchungen erkannte ich sofort die außerordentlich großen Schwierigkeiten, welche bei dem Nachweis

des *Bacillus icteroides* im Blute sowie in den einzelnen Organen aufgetreten waren, und zwar, weil die direkte bakteriologische Untersuchung der Milz die Anwesenheit einer ziemlich großen Anzahl von polymorphen Keimen in diesem Organe ergab.

Es handelte sich hier zweifelsohne um einen der Fälle, wo im letzten Stadium der Erkrankung die Erreger der sekundären Infektion die spezifischen Gelbfieberbacillen ganz und gar übertroffen hatten, so daß durch die sonst üblichen Isolierungsmethoden für den *Bacillus icteroides* kein befriedigendes Resultat zu erreichen war. Daher die Notwendigkeit, ein Verfahren zu suchen, durch welches es mir gelingen sollte, eine größere Menge der von mir aufzufindenden Keime nachzuweisen, d. h. ein Mittel zu finden, welches, wie bei der Methode Sanarellis, behufs Nachweises des *Bacillus* in den Geweben der an Gelbfieber zu Grunde gegangenen Kranken, eine rasche, intensive Entwicklung des in Rede stehenden *Bacillus* bewirken konnte.

Die Methode Sanarellis, welche nun überall wohlbekannt ist, und die darin besteht, daß die zu untersuchenden Gewebstücke in den Thermostaten bei 37° C 12 Stunden lang gesetzt werden, bewährt sich in der Praxis nicht, um den *Bacillus icteroides* zu isolieren, der durch die Entwicklung anderer Mikroben, welche eventuell mit dem ersteren wohl in ursächlicher Symbiose in dem Medium vorliegen können, gar nicht gehemmt wird, und die Methode für sich bildet ferner nicht immer die günstigsten Bedingungen zur genauen, absoluten Unterscheidung des *Bacillus icteroides* von den anderweitig vorhandenen Bakterienarten und zur Isolierung derselben.

Um ein praktisches Resultat zu erreichen, sollte man dahin gelangen, daß — falls es unmöglich ist, die Entwicklung andersartiger, in dem zu untersuchenden Material vorliegender Keime zu hindern — die rasche Vermehrung und die Gruppierung des *Bacillus icteroides* in gleicher Weise hervorgerufen wird, so daß derselbe dem schädlichem Einfluß der übrigen antagonistischen, mit ihm häufig in Symbiose getretenen Bakterien entzogen und daher leicht im Kulturmedium aufgefunden und isoliert wird.

Damit solche Bedingungen in den Kulturmedien tatsächlich beständen, und zwar für eine Bakterie, welche, wie es bei dem *Bacillus icteroides* der Fall ist, fast durchweg in absoluter Minderzahl gegenüber den andersartigen, mit ihr in Symbiose in dem Untersuchungsmaterial vorhandenen Mikroben steht und welche sehr wahrscheinlich — wie es bereits Sanarelli nachgewiesen hat — von den letzteren leicht besiegt wird, war es unbedingt nötig, daß durch die neue Methode im Kulturmedium besondere, dem *Bacillus icteroides* günstige, sich auf eine spezifische Reaktion gründende Verhältnisse herbeigeführt würden.

Diese Bedingungen habe ich zu realisieren versucht, indem ich dazu die Spezifität der Absorptionsprozesse der Mikroben verwendete, eine Eigentümlichkeit, die bereits durch die Forschungen Pasteurs über die Gärungen bekannt und nachträglich durch die Untersuchungen zahlreicher Beobachter bestätigt worden ist.

Ferner dachte ich, bei meinen Untersuchungen das spezifische Agglutinationsvermögen des den Kulturmedien zugesetzten anti-maryllischen Serums zu benutzen.

Eine auf einem so genau bestimmten wissenschaftlichen Grundsatz fußende Isolierungsmethode schien mir im ersten Augenblicke un-

fehlbar und ausgezeichnet in Hinsicht auf das praktische Resultat zu sein; nach einer weiteren genaueren analytischen Prüfung konnte ich jedoch die verschiedenen Schwierigkeiten, die dem vorgesetzten Ziele entgegen standen, voraussehen.

Während wir nach den neuesten Forschungen über die verschiedenen, die umfassende Frage der Immunität bildenden Vorgänge nun wissen, daß sowohl die Absorption als die Ernährung der Mikroben von einer molekularen Selektion abhängig sind, liegen andere in jüngster Zeit ausgeführte Untersuchungen vor, welche den Nachweis dafür geliefert haben, daß solche Grundsätze nicht als absolut richtig gelten können.

Was nun das Agglutinationsvermögen der antibakterischen Sera im allgemeinen betrifft, so ist es bekannt, daß ihre Spezifität über eine gewisse Grenze zu suchen ist, bis wohin die Bakterienagglutinine eines Serums manche molekulare Affinität auch mit andersartigen Keimen besitzen können.

Ferner stellte ich mir noch eine zweite Frage: Angenommen, daß es mir gelingen könnte, durch die Einwirkung der in dem spezifischen Serum enthaltenen Agglutinine in den Kulturen eine massenhafte Entwicklung des *Bacillus icteroides* zu erhalten, wäre es mir alsdann möglich gewesen, aus dem flüssigen Kulturmedium, wie es sein muß, damit die Agglutination stattfindet, den agglutinierten *Bacillus* zu isolieren?

Diese beiden hochwichtigen Fragen, welche sofort bei der Betrachtung der neuen Methode hervortraten, habe ich versucht, in folgender Weise zu lösen:

Durch sorgfältiges Ausschaltungsvorgehen habe ich die spezifische agglutinierende Dosis des antiarmyallischen Serums, d. h. den Auflösungsgrad des Serums in dem flüssigen Kulturmedium, bestimmt, durch welche das allgemeine Agglutinationsvermögen für die andersartigen, im zu untersuchenden Material, eventuell in Symbiose, mit dem *Bacillus icteroides* vorhandenen Keime ausgeschlossen wird. Um alsdann die Isolierung der im Kulturmedium flockenartig agglutinierten Bacillen hervorzurufen, stellte ich die Kulturen auf der im Brutofen flüssig erhaltenen Gelatine an — damit die Agglutination leichter stattfände — und dann ließ ich die Gelatine sofort und rasch erstarren; auf diese Weise konnte ich den *Bacillus* untersuchen und ihn aus den sich allmählich in den tieferen Kulturschichten bildenden Gerinnseln isolieren.

Die Technik meiner Methode ist die folgende:

Vor allem bestimme ich die agglutinierende spezifische Dosis des Kontrollserums, indem ich zuerst mehrere Bouillonkulturen von verschiedenen Keimen anfertige, zu welchen das antiarmyallische Serum in verschiedenem Quantum zugesetzt wird. Dazu wähle ich solche Mikroben, welche am häufigsten im Organismus mit dem *Bacillus icteroides* symbiotisch vorkommen; dann stelle ich eine Gelatine her, zu welcher ich das antiarmyallische Serum in der spezifischen agglutinierenden Dosis zusetze. Diese Gelatine wird in mehrere zweckmäßig eingeschnürte und darauf an der Flamme trichterförmig verschmolzene Glasröhrchen verteilt.

In diese Glasröhrchen wird das zu untersuchende Material in kleiner Menge oberflächlich eingimpft und in den Brutofen bei 37° C gestellt.

Nach wiederholten Versuchen mußte ich mich davon überzeugen, daß 10- bis 12-proz. Gelatine, welche scheinbar den großen Vorteil einer leichteren Erstarrung hatte, tatsächlich gar nicht empfehlenswert ist, weil die starke Densität des Mediums die Bildung großer Flocken von agglutinierten Bacillen sowie ihren Niederschlag hindert.

Demzufolge ist die 7-proz. Gelatine die am besten dazu geeignete; sogar nach 5—6 Stunden kann man in derselben die Bildung von weißlichen, aus agglutinierten Bacillen bestehenden Flocken beobachten, welche nach und nach am Boden der Glasröhrchen niederfallen, während an der Oberfläche der Gelatinemasse eine gleichmäßige Trübung auftritt. Meistens ist nach 10—12 Stunden die gleichmäßige Trübung in den oberen Kulturschichten sehr prägnant, und in den tieferen, wo die sich isolierenden Bacillen allmählich wegen der Densität des Mediums spärlicher werden, sieht man große agglutinierte Bacillenflocken, welche nach und nach an der Spitze des zugeschmolzenen Röhrchens, wo die Gelatine vollständig klar ist, sich ansammeln.

Die Kulturen werden sodann einer niedrigeren Temperatur ausgesetzt bis zur Erstarrung der Gelatine, welche rasch vor sich geht, wenn auf die äußeren Wände des Röhrchens ein Strahl von Aethylchlorid gerichtet wird.

Jetzt könnte das zugespitzte Ende des Röhrchens abgebrochen und mittelst einer dünnen Platinnadel die agglutinierten Bacillenflocken hervorgezogen werden; doch ist man so nie sicher, die Isolierung in positiver Weise zu erreichen.

Wenn in dem verdächtigen, auf *Bacillus icteroides* zu untersuchenden Material Bakterienarten vorhanden sind, welche — wie der *Streptococcus* — ihrer Natur nach sich agglutinieren und fleckenartig entwickeln, oder umfangreiche Massen bilden, welche ihrer eigenen Schwere wegen in die tieferen Kulturschichten herabsinken können — wie z. B. einige *Proteus*-Varietäten u. s. w. — dann könnte es ja vorkommen, daß man gar nicht zum beabsichtigten Zwecke kommt, falls weitere genauere Untersuchungen versäumt werden.

Um diesem Umstand vorzubeugen, verfähre ich nun in folgender Weise:

Nach Abbrechung des zugespitzten Röhrchenendes wird der Inhalt in äußerst dünner Schicht in eine sterilisierte Petri-Schale gegossen; alsdann schreite ich zur mikroskopischen Untersuchung, zuerst bei schwacher, dann bei stärkerer Vergrößerung der in der Gelatinemasse vorhandenen Flocken.

Auf diese Weise wird die Identität der zu isolierenden Flocken, indem ich dieselben unter dem Mikroskop von der Masse herausziehe, festgestellt.

Hier möchte ich bemerken, daß der *Bacillus icteroides* — wie übrigens viele andere Bakterien — wenn er sich dank dem Vorhandensein der Serumagglutinine im agglutinierten Zustand entwickelt, in durchaus charakteristischer Weise lange, dünne Kettchen bildet, welche sich gruppieren und zu einem aus dichten Maschen bestehenden Netzgewebe zusammensetzen.

Unter solchen Verhältnissen gelingt es bei sorgfältiger Beobachtung, die aus agglutinierten Massen des *Bacillus icteroides* bestehenden Gebilde von denen des *Streptococcus* oder irgend eines in dichte Zoogloen zusammengeflossenen *Bacillus* zu unterscheiden.

Wenn ich die deutlich charakterisierten Stellen genau aufsuchte,

geling es mir stets, den *Bacillus icteroides* zu isolieren, sei es durch direkte Einsaat in Bouillon, sei es durch eine neue, nach dem oben erwähnten Verfahren angefertigte Kultur, um manche eventuell mechanisch mit den Flocken der agglutinierten Bacillen herabgesunkenen Keime auszuschließen.

Durch diese Methode habe ich ohne Schwierigkeiten den *Bacillus icteroides* aus dem Blute, der Leber, der Galle und aus dem Darm in dem angegebenen Gelbfieberfall isolieren können, ferner gelang es mir stets, den künstlich mit zahlreichen Bakterienvarietäten gemischten *Bacillus icteroides* nachzuweisen, während bei sämtlichen Isolierungsversuchen in 4 Fällen von schwerem Ikterus, sei es *intra vitam* aus dem Blute, sei es *post mortem* in den verschiedenen Organen, das Resultat durchweg ein negatives war, so gleichfalls bei den von mir in diesem Sinne mit dem Wasser der Wasserleitung von S. Paulo und im Erdboden des Isolierungs-Krankenhauses angestellten Untersuchungen.

Identifikation des *Bacillus icteroides*. — Die beiden von mir in den 2 Fällen von Gelbfieber isolierten Keimen bildeten alsdann Gegenstand weiterer genauer Untersuchungen, um ihre vollständige Identität mit dem typischen *Bacillus icteroides*, wie er von Sanarelli entdeckt und beschrieben worden ist, nachzuprüfen. Ich stellte außerdem eine Reihe von Vergleichsuntersuchungen an zu dem Zwecke, ihre Spezifität zu kontrollieren.

Im nachfolgenden werde ich die Resultate dieser meiner Untersuchungen zusammenfassen:

Diagnostische Bedeutung der kulturellen und biologischen Charaktere des *Bacillus icteroides*. — Betrachtet man die morphologischen und biologischen Merkmale des *Bacillus icteroides*, so kommt man zur Schlußfolgerung, daß dieselben meistens keine bestimmte Spezifität gegenüber jenen andersartigen Keimen besitzen.

Sehen wir von dem feineren Bau und von der Zellenanordnung, sowie von der Beweglichkeit ab, welche dem *Bacillus icteroides* wie anderen Mikrobien gemein sind, so bemerken wir — in Hinsicht der kulturellen Charaktere — daß das von Sanarelli als spezifisch für den von ihm entdeckten *Bacillus* erklärte Merkmal („Siegellackpetschaft“) der Agarkultur in gewissen Verhältnissen, so in manchen gut charakterisierten Exemplaren des *Bacillus icteroides* nicht deutlich ist. In den Gelatineplattenkulturen kann ferner der *Bacillus icteroides* einen Pleomorphismus zeigen, obwohl dieser letztere nicht so prägnant zu sein pflegt, wie es bei dem *Bacillus coli* der Fall ist, von welchem er sich außerdem durch mikrochemische Eigenschaften unterscheidet. Der *Colibacillus* greift, obwohl nicht in sehr intensivem Grade, Eiweiß an, während bei dem *Bacillus icteroides* dies vermißt oder doch nur in undeutlicher Weise beobachtet wird.

Die *Icteroides*-Kulturen zeigen außerdem keine Indolbildung; andererseits ist uns durch die Untersuchungen Lambkes und m. a. bekannt, daß auch anindolische typische *Colibacillen* vorkommen.

Der *Bacillus icteroides* ist bezüglich des zymogenetischen Vermögens von dem typischen *Bacillus Escherich* dadurch zu unterscheiden, daß die von ihm bewirkte Zuckergärung schwächer ist, obwohl dem *Bacillus icteroides* diese Eigenschaft in leichterem Grade und gegenüber allen Zuckerarten doch innewohnt. Endlich darf man wohl

behaupten, daß häufig ein Vergleich zwischen den morphologischen und biologischen Charakteren des *Bacillus icteroides* und denjenigen eines Colimorphen oder einer Varietät des *B. typhosimilis* keinen sicheren Schluß liefert.

Dieser Umstand bildet eine der hauptsächlichsten Schwierigkeiten für die Isolierung und Identifizierung des *Bacillus icteroides*, wenn nicht alle die am besten dazu geeigneten Untersuchungsmittel verwertet werden, durch welche in unzweideutiger Weise die Diagnose des *Bacillus icteroides* gegenüber einem die habituelle Flora des Gelbfiebers, namentlich in den beschriebenen Fällen bildenden Mikroorganismus, festzustellen ist.

Nach diesen Betrachtungen, und trotzdem die beiden von mir isolierten Keime die biologischen und kulturellen, von Sanarelli für den *Bacillus icteroides* als eigentümlich bezeichneten Merkmale zeigten, dachte ich, die der Lebenstätigkeit eines ins saprophytische Leben übertragenen pathogenen Keimes innewohnenden Merkmale als einfaches diagnostisches Hilfsmittel gelten zu lassen, welche Merkmale übrigens aus verschiedenen Gründen sich ändern können, unter welchen die Unbeständigkeit der chemischen Zusammensetzung der Kulturmedia bedeutungsvoll ist.

Ich nahm mir also vor, meine Versuche nach einer besser dazu geeigneten Richtung fortzusetzen, nämlich durch die Nachprüfung der spezifischen Reaktion der beiden isolierten Keime gegenüber dem Blutserum von Gelbfieberkranken und dem antiarmyallischen Serum und indem ich ihr pathogenes Vermögen bestimmte, welche Charaktere von der Lebenstätigkeit der als Parasiten des Menschenkörpers betrachteten Keime abhängen und den größten Wert für die Diagnose eines Krankheitserregers besitzen.

Ueber die Spezifität der Bakterienagglutinine und des Sensibilisationsstoffes im antiarmyallischen Serum sowie im Blutserum der Gelbfieberkranken und der an dieser Erkrankung zu Grunde gegangenen Patienten.

Da ich ein gewisses Quantum von antiarmyallischem Serum (zu Montevideo dargestellt), von einem an Gelbfieber gestorbenen Patienten stammendem Blutserum, sowie von einem in mehreren Sitzungen aus einem Gelbfieberkranken entnommenem Blutserum zur Verfügung hatte, stellte ich einige Versuche über das agglutinierende und sensibilisierende Vermögen dieser drei Sera auf die zu untersuchenden Keime an.

Nachträglich schienen die Vergleichsversuche des allgemeinen antibakteriellen mit dem spezifischen Vermögen dieser, sowie anderweitiger Sera interessant, indem ich dieselben nacheinander mit verschiedenen Mikrobenvarietäten in Berührung setzte. Bei dieser Untersuchungsreihe — außer den oben genannten Sera — benutzte ich ein antityphisches, aus dem Institute für Serotherapie zu Bern stammendes Serum, ein im hiesigen Institute für Infektionskrankheiten hergestelltes Serum und die aus zwei Typhusfällen und aus vier schweren Ikterusfällen mehrmals während des ganzen Krankheitsverlaufes, während der Rekonvaleszenz und post mortem entnommenen Sera.

Die zum Vergleich gestellten Keime waren folgende: Die zwei von mir isolierten Mikroben, die ich mit A und B bezeichne, der *Bacillus Eberth*, ein *Colibacillus* und ein *Proteus vulgaris*.

Ich mußte mich bald überzeugen, daß, um ein praktisch und sicher

verwertbares Resultat zu erhalten, es vorzuziehen ist, das Agglutinationsvermögen durch Vegetation, indem die Absorptionsfähigkeit der Keime herangezogen wird, und nicht diese letztere durch Kontakt zu bestimmen. Dazu kam ich nach wiederholten Versuchen, welche den Nachweis dafür geliefert haben, daß die Bestimmung des Agglutinationswertes eines Serums durch Kontakt eine bedeutungsvolle Fehlerquelle bildet.

Setzt man einem gewissen Quantum der Bouillonkultur oder der Aufschwemmung eines Keimes in der physiologischen NaCl-Lösung die für die gewünschte Lösung hinreichende Probenserummengung zu, so verbinden sich die in dieser letzteren enthaltenen Bakterienagglutinine sehr bald mit dem agglutinierbaren Stoff, welcher im Leibe der mit diesen in Berührung kommenden Keime vorhanden ist, und rufen somit die Agglutination sowie die Erschöpfung der letzteren hervor, ehe die zur gleichmäßigen Auflösung des Serums in der Kulturflüssigkeit gerichteten Manipulationen vollendet sind.

Bei diesen Versuchen habe ich oft in den Proberöhrchen die sofortige Bildung der aus den agglutinierten Keimen bestehenden Flocken beobachten können, welche nach und nach am Boden des Röhrchens sich absetzten. Die darüber bleibende Flüssigkeit zeigte eine gleichmäßige Trübung, und dies geschah sowohl wenn die mit Flüssigkeit beschickte Serummengung für die nach einem gewissen Zeitraum stattzufindende, vollständige Agglutination der Kultur genügend war, als auch wenn dies nicht der Fall war, diese Erscheinung hing von einer leicht begreiflichen Ursache ab.

Die mit dem Nährmedium angefertigte Kultur, welcher die nötige Serummengung zugesetzt worden ist, gestattet nämlich, die in Gegenwart der im Kulturmedium homogen verteilten Agglutinine liegenden Keime während ihrer Entwicklungsstufe zu untersuchen, woraus eine Summe von Verhältnissen geliefert wird, welche auch in physiologischer Hinsicht günstiger sind; und zwar aus dem Grunde, weil dadurch zwei hochwichtige Faktoren nicht ausgeschlossen bleiben; diese letzteren sind: 1) die Affinität der Ernährungsassimilation und 2) die Schutzreaktion des Keimes gegen das Medium, in welchem er sich entwickeln soll. Diese Momente dürften wohl einen großen Einfluß auf das Endergebnis üben!

In sämtlichen von mir ausgeführten Versuchen war ich stets bestrebt, immer unter möglichst gleichen Verhältnissen zu arbeiten, indem ich jedesmal die gleiche Bouillonmenge anwandte und die Kulturen einer stets gleichen Temperatur und während einer durchweg gleichen Zeitperiode aussetzte.

Den Sensibilisationsstoff bestimmte ich nach der Methode Bordet-Gengou, die ich hier im nachstehenden schildern möchte:

In ein Reagierröhrchen bringt man $\frac{12}{10}$ ccm des zu untersuchenden Serums, das bis 55° C und während $\frac{1}{2}$ Stunde behufs Ausschließung der alkalischen Reaktion erwärmt wird; dazu werden alsdann $\frac{4}{10}$ ccm einer dichten Emulsion des gegebenen Keimes zugesetzt, welche letztere durch Auflösung einer gewissen Menge der Agarkultur in der normalen physiologischen NaCl-Lösung hergestellt wird, und endlich fügt man $\frac{2}{10}$ ccm normalen, nicht erhitzten (alexinierten) Serums dazu. — Nach 6 Stunden, während welcher Zeit diese Mischung bei Zimmertemperatur gehalten wird, fügt man $\frac{1}{10}$ ccm sensibilisierter Blutkörperchen zu, d. h. mit einem 2mal so großen Quantum eines für dieselben hämolytisch wirkenden, auf 55° C (nicht alexinierten) erhitzten Serums, und nachdem sie,

behufs Ausrottung der Alexine wiederholt mit der physiologischen NaCl-Lösung gewaschen worden sind.

Diese Mischung wird mehrmals gerührt und dann an der Turbine zentrifugiert.

Wenn das Probeserum kein sensibilisierendes Vermögen für den mit ihm vermischten Keim hat, ist in dem Glasröhrchen ein hämolytischer Vorgang wahrzunehmen, welcher sich dadurch kund gibt, daß die über dem festen, durch das Zentrifugieren niedergeschlagenen Teil liegende Flüssigkeit eine rosarote Färbung zeigt, welche vom Pigment der aufgelösten roten Blutkörperchen gebildet wird.

Besitzt aber das Serum ein sensibilisierendes Vermögen, dann pflegt diese Färbung nicht stattzufinden.

Also beweist die Ab- oder Anwesenheit dieser hämolytischen Erscheinung das Fehlen oder die Anwesenheit des sensibilisierenden Vermögens des in Rede stehenden Serums. Besitzt das Serum dieses Vermögen für die mit ihm vermischten Keime, dann wird von diesen der sensibilisierende Stoff absorbiert und das in der Mischung vorhandene Alexin gebunden. In diesem Falle finden die sensibilisierten, der Mischung nachher zugesetzten roten Blutkörperchen kein Alexin darin und bleiben somit unverändert. Wenn das Serum keinen sensibilisierenden Stoff besitzt, dann werden die sensibilisierten roten Blutkörperchen in der Mischung das von den Keimen nicht resorbierte Alexin vorfinden, und es kommt alsdann zu ihrer Zerstörung und darauffolgender Hämolysis.

Ich erachte es als zweckmäßig, hier einige Fehlerquellen zu erwähnen, welche bei dem Nachweis des agglutinierenden und sensibilisierenden Vermögens zu vermeiden sind, wenn man zu befriedigenden Ergebnissen gelangen will:

Wenn das agglutinierende Vermögen eines Serums festzustellen ist, dann muß man dazu nicht nur die Grenzen, bis wohin ein Serum die vollständige Agglutination und Präzipitation eines gegebenen Serums bewirken kann, sondern auch den Punkt bestimmen, wo es eine lähmende Wirkung und eine unvollständige Agglutination des Keimes ergibt, welche zuweilen bloß durch die mikroskopische Untersuchung nachzuweisen ist.

Das Abwaschen der roten Blutkörperchen mit einer NaCl-Lösung, um das Alexin zu beseitigen, erfordert die größte Sorgfalt, indem jedesmal die Mischung zentrifugiert und die Abwaschflüssigkeit mittels einer Pipette angesogen wird, um dann noch eine andere frische Lösung zuzusetzen, wie es Bordet und Gengou empfehlen.

Dieser Vorgang soll so oft wiederholt werden, bis man durchaus darüber sicher ist, daß (durch die mikroskopische Untersuchung) das spezifische Serum die roten Blutkörperchen einfach agglutiniert, ohne die Zellen zu zerstören.

Große Aufmerksamkeit muß man endlich der hämolytischen Wirkung schenken, mag dieselbe auch schwach sein, welche die physiologische normale NaCl-Lösung auf die Erythrocyten ausüben kann. Oft ist die mikroskopische Untersuchung unentbehrlich zur Feststellung der eventuellen Integrität der roten Blutkörperchen, denn man kann nicht immer über ein hämolytisches Serum verfügen, in welchem nicht ein gewisses Quantum von aufgelöstem Hämolsin enthalten ist.

Handelt es sich darum, das sensibilisierende Vermögen eines Serums festzustellen — wie dies bereits für die Agglutinine bemerkt worden ist —

dann muß man die verschiedenen Nüancen des Vorganges in Betracht ziehen, indem man beobachten muß, ob die die Reaktion beweisende Hämolyse vollständig oder teilweise, und nach welcher Zeit sie auftritt.

Um die einzelnen Grade der sensibilisierenden Einwirkung der Sera festzustellen, habe ich konventionelle Benennungen angewandt, welche ziemlich genau sind, wenn die einzelnen Versuche womöglich stets unter gleichen Verhältnissen ausgeführt werden. Jedoch besitzen wir für die Bestimmung des Grades des hämolytischen Vorganges keine beständig genaue Methode. Wir wollen ja hoffen, bald eine präzise hämolytische Methode zu bekommen, welche sowohl praktisch als wissenschaftlich bei der graduellen Bestimmung dieser Erscheinung ausreicht, deren Erforschung zahlreiche Fragen in der Cytobiologie lösen wird, welche gegenwärtig noch unbekannt oder kaum bestimmt sind.

Bei dieser Untersuchungsreihe habe ich folgende Benennungen gebraucht: Starkes sensibilisierendes Vermögen, wenn die dem festen, durch Zentrifugieren abgesetzten Mischungsteil überliegende Flüssigkeit keine Färbung zeigt; sensibilisierendes Vermögen: mittelstark, wenn die Flüssigkeit eine rosarote Färbung zeigt, und wenn durch die mikroskopische Untersuchung des Niederschlages die Auflösung mehrerer Erythrocyten nachzuweisen ist; sensibilisierendes Vermögen: schwach, wenn die rosarote Färbung der Flüssigkeit ausgeprägter ist und die roten Blutkörperchen meistens verändert sind; sensibilisierendes Vermögen: null, wenn durch die direkte Untersuchung der Flüssigkeit und durch die mikroskopische Besichtigung des Niederschlages eine vollständige Hämolyse nachgewiesen wird.

Solche Bestimmungen wurden von mir festgestellt, indem ich die einzelnen Mischungen der Zimmertemperatur aussetzte und sie wiederholt aufschüttelte, um die roten Blutkörperchen mit den geringsten Spuren der sensibilisierenden Stoffe der Mischung in Berührung kommen zu lassen, damit die Hämolyse ihre Einwirkung vollständig entfalten können.

In der Tabelle auf p. 473 sind die Resultate dieser Untersuchungen zusammengefaßt.

Aus diesen Ergebnissen kann man nun folgende Schlußfolgerungen ziehen:

Zunächst ergibt sich, daß die spezifischen, künstlich hergestellten Antikörper des Blutserums der Tiere viel wirkungsfähiger sind, als jene von den an irgend einer Erkrankung leidenden oder bereits in Rekoneszenz getretenen Patienten.

Die Menge der im Blutserum der mit Gelbfieber behafteten oder daran zu Grunde gegangenen Patienten enthaltenen spezifischen Antikörper ist geringer als bei an Typhus leidenden oder diese Infektion überstanden habenden Kranken.

Die ein starkes, spezifisch antibakterielles Vermögen zeigenden Sera enthalten zuweilen einige für anderweitige Bakterienarten als Antikörper wirkende Stoffe; diese Fähigkeit ist allerdings schwächer als das spezifische Vermögen, wenn die betreffenden Versuche, um jeder Fehlerquelle vorzubeugen, mit der größten Sorgfalt ausgeführt werden.

Bei den mit dem Blutserum von Gelbfieberkranken oder -leichenamen sowie bei Icterus gravis angestellten Versuchen stehen diese beiden Charaktere gar nicht in Verbindung untereinander, d. h. einem gewissen — allgemeinen oder spezifischen — Agglutinationsvermögen entspricht die völlige Abwesenheit eines sensibilisierenden Vermögens.

	Bestimmung des Agglutinationsvermögens der Sera				Bestimmung des Sensibilisationsvermögens der Sera			
	Bacillen A u. B	Coli-bacillus	Bacillus Eberth	Proteus vulgaris	Bacillen A u. B	Coli-bacillus	Bacillus Eberth	Proteus vulgaris
Antiamaryllisches Serum	1:4000	1:80	1:40	1:40	stark	mittel	mittel	schwach
Serum eines Gelbfieberkranken (Anfang der 2. Periode)	1:10	1:8	—	—	⊖	⊖	⊖	⊖
Serum eines Gelbfieberkranken (Anfang der Rekonvaleszenz)	1:15	1:8	—	—	schwach	⊖	⊖	⊖
Serum eines Gelbfieberkranken (vollständige Genesung)	1:20	1:8	—	—	⊖	⊖	⊖	⊖
Serum einer Gelbfieberleiche	1:5	1:5	1:5	1:5	⊖	⊖	⊖	⊖
Serum eines schweren Ikterus								
do. 1. Fall	1:7	1:7	1:7	1:7	⊖	⊖	⊖	⊖
do. 2. "	1:5	1:5	1:5	1:5	⊖	⊖	⊖	⊖
do. 3. "	1:5	1:5	1:5	1:5	⊖	⊖	⊖	⊖
do. 4. "	1:10	1:10	1:10	1:10	⊖	⊖	⊖	⊖
Serum aus einem Ikteruskadaver	1:10	1:10	1:10	1:10	⊖	⊖	⊖	⊖
Serum aus Typhoid (1. Woche)	—	1:10	—	—	⊖	⊖	⊖	⊖
Während der Infektionsakme	—	1:10	—	—	⊖	⊖	⊖	⊖
In voller Rekonvaleszenz	—	1:10	1:40	—	⊖	⊖	⊖	⊖
Zweiter Fall (1. Woche)	—	—	—	—	⊖	⊖	⊖	⊖
Während der Infektionsakme	—	—	1:15	—	⊖	⊖	⊖	⊖
In voller Genesung	—	—	1:50	—	⊖	⊖	mittel	⊖
Antityphisches Serum des Institutes in Bern	1:50	1:60	1:2000	1:30	mittel	mittel	stark	schwach
Antityphisches Serum des Institutes für Bakteriologie in St. Paulo	1:30	1:60	1:1800	1:20	schwach	mittel	stark	schwach

Das Blutserum der Typhuskranken sowie der Gelbfieberpatienten kann den Colibacillus schwach agglutinieren.

Daß die spezifischen Sera eine Menge von Antikörpern enthalten, welche etwas größer ist als die des Blutserums von Menschen, bei welchen die Infektion noch besteht oder welche dieselbe überstanden haben. Dies ist eine Erscheinung, welche gar nicht in Erstaunen setzen soll; das Vorkommen der Bakterioagglutinine und der Bakteriolyse im Blutserum, als Beweis der antibakterischen Wirkungsfähigkeit, wird durch die Verdauung der im Bakterienleibe enthaltenen Plasmoproteine im Organismus bewirkt.

Die in einem gegebenen Serum enthaltene Antikörpermenge wird also von der Menge der Bakterienkörper abhängen, welche vom Organismus, aus welchem das Serum stammt, verdaut wird; und dieses Quantum soll zweifelsohne in den gegen eine Infektion vaccinierten Tieren größer sein als in den Organismen, welche die gleiche Infektion spontan acquiriert haben.

Aus meinen Versuchen würde sich also ergeben, daß im Blutserum — bei Gelbfieberkranken — sowohl auf dem Höhepunkt der Infektion als nach vollständiger Genesung ein gewisses, doch nicht sehr hochgradiges, antibakterisches, spezifisches Vermögen für die beiden von mir isolierten Keime vorhanden ist. Dazu ist noch zu bemerken, daß die Vermehrung und Zerstörung des Bacillus icteroides in den Gelbfieberkranken gar nicht energisch, aktiv stattfindet. Die oft unüberwindlichen Schwierigkeiten, welche bei dem Nachweis dieses Keimes

auftreten, stützen vollkommen diese Hypothese. Das Gelbfieber ist, angesichts des ganz besonderen Krankheitsbildes, als eine schwere Intoxikation anzusehen, und der rasche Verlauf desselben gestattet nicht, daß im Organismus die spezifischen Antikörper in beträchtlicher Menge elaboriert werden. Doch hat uns die Erfahrung gezeigt, daß selbst bei der typhösen Infektion, welche zu zahlreichen Untersuchungen über die Spezifität der antibakterischen Substanzen Gelegenheit gab, das antibakterielle Vermögen häufig fehlt oder daß es sehr schwach ist und zwar sowohl während der Infektion als auch bei der Immunität.

Aus den neuesten Forschungen ergibt sich die Erklärung der Erscheinung, daß die antityphösen und antiarmyillischen Sera, welche eine beträchtliche Menge von spezifischen Antikörpern enthalten, eine antibakterielle Wirkung auf andere Keime ausüben können; die Spezifität der Antikörper muß keineswegs als eine unbeschränkte aufgefaßt werden.

Ebenso wie die Cytoagglutinine und Cytolysine, welche eine spezifische Wirkung für die sie erzeugenden Zellen besitzen, auch von anderen Gewebeelementen absorbiert werden können, kommt es gleichfalls vor, daß die für die sie erzeugenden Keime spezifischen Bakterioagglutinine und Bakteriolyse die gleiche Wirkung auf andere Mikroben entfalten können. Dies hängt meistens von der relativen Identität der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Bakterienzellen ab.

Das von mir in den Seren der Gelbfieber- und der Ikteruskranken nachgewiesene allgemeine Agglutinationsvermögen hängt von den im Blute vorhandenen Gallenbestandteilen ab, wie es verschiedenartig zuweilen bei dem Gelbfieber und stets bei dem schweren Ikterus der Fall ist.

Hier möchte ich nur an die Untersuchungen Köhlers erinnern, welche den Nachweis geliefert haben, daß dieses Agglutinationsvermögen der Galle vorwiegend der taurocholischen Säure zu verdanken ist.

Aus der Betrachtung meiner Untersuchungsergebnisse geht endlich hervor, daß das Blutserum von Gelbfieber- und Typhuskranken ein Agglutinationsvermögen auf den *Colibacillus* ausüben kann.

Diese Erscheinung soll eigentlich nicht mit der ablaufenden Infektion in Zusammenhang gebracht werden, denn es ist uns wohl bekannt — nach den Köhlerschen Versuchen — daß das Blutserum normaler Individuen den *Colibacillus* agglutinieren kann.

Untersuchung über die pathogene Wirksamkeit des *Bacillus icteroides*.

Wir wissen aus Erfahrung, daß bei dem vollständigen Nachweise der Spezifität eines Keimes als Erreger einer gegebenen Infektion häufig die experimentelle Hervorrufung der Krankheit ausbleibt, obwohl es zuweilen gelingt, einige pathognomonisch charakteristische Symptome derselben hervorzurufen.

Was nun den *Bacillus icteroides* betrifft, so ist es ja bekannt, daß es keinem Forscher gelungen ist, durch denselben bei den Versuchstieren das genaue und vollständige Krankheitsbild des Gelbfiebers des Menschen hervorzurufen.

Sämtliche Forscher, die sich mit der Frage beschäftigt haben, behaupten jedoch, bei einzelnen Versuchstieren einige der pathognomonischen Symptome durch Inokulation mit lebenden Kulturen oder mit den Toxinen des *Bacillus icteroides* hervorgerufen zu haben.

Da ich mir vorgenommen hatte, keines der diagnostischen Hilfs-

mittel zu versäumen, um festzustellen, ob es sich bei den beiden von mir isolierten Keimen tatsächlich um den *Bacillus icteroides* handelte, so stellte ich Versuche über ihre pathogene Wirkung an.

Aus den ausgeführten Experimenten über die Virulenz und Toxizität der beiden von mir isolierten Keime ergibt sich, daß dabei keine nennenswerten Unterschiede bestehen.

Die mit den lebenden sowie mit den abfiltrierten Kulturen der beiden Keime in Meerschweinchen und Kaninchen ausgeführten Inokulationen lieferten mir den Nachweis, daß die Art des Prozesses keine bemerkenswerten Unterschiede gegenüber anderen experimentellen Infektionen und Intoxikationen, wie z. B. denjenigen des *Colibacillus* und *Proteus vulgaris*, zeigte (ausgenommen die cyklische, 5 Tage andauernde Periode bei der Kanincheninfektion).

Nur bei dem Hunde vermag das Icteroides-Gift einzelne pathognomonische Symptome des Gelbfiebers des Menschen hervorzurufen; dies ergibt sich aus den Forschungen Sanarellis und mehrerer anderer Beobachter, die sich mit der Frage beschäftigten. Demnach stellte ich einige Versuche bei dem Hunde an und führte außerdem Vergleichsuntersuchungen zwischen den von mir isolierten und anderen Keimen — *Colibacillus*, *Bacillus Eberth*, *Proteus vulgaris*, *Diphtheriabacillus* — aus.

Nach Sanarelli soll die endovenöse Inokulation sowohl der lebenden Kulturen als der Toxine des *B. icteroides* der beste Weg sein, um positive Resultate beim Hunde zu erzielen.

Bei der Bestimmung der sicher letalen Dosis der lebenden Kultur und des Toxins meiner beiden Mikroben im Vergleich mit den Kulturen und den Toxinen des *Colibacillus*, des *B. Eberth*, des *B. diphtheriae* und des *Proteus vulgaris* benutzte ich junge, 24 Stunden alte Bouillonkulturen und 15 Tage alte, abfiltrierte Kulturen.

Die sicher letale Dosis von lebender Kultur und von Toxin, die in die Venen von 4—5 kg wiegenden Hunden inokuliert worden war, war bei den zwei von mir isolierten Bacillen 3 resp. 5 ccm.

Bei Hunden von einem etwa gleichen Körpergewicht ergab sich ferner, daß die infektiöse und toxische Wirkung des *Proteus vulgaris* im allgemeinen stärker ausfällt als bei meinen beiden Keimen; die übrigen Keime sind weniger virulent und toxisch.

Bald und fast unmittelbar nach der Inokulation der Kultur und der Toxine der beiden Probekeime erscheint bei dem Hunde als Reaktions-symptom das Erbrechen.

Ich konnte auch beobachten, daß die mit dem *Proteus* und dessen Toxinen ausgeführten Inokulationen dieselbe Erscheinung mit beinahe gleicher Schnelligkeit und zuweilen auch mit größerer Intensität hervorrufen.

Die Kultur sowie die Toxine der Diphtherie ergaben mir niemals diese Wirkung.

Ich beobachtete ferner, daß die im Verlaufe des infektiösen und toxischen Prozesses auftretenden krankhaften Erscheinungen — Diarrhöen und Darmblutungen — durch die Inokulationen mit dem *Proteus* in prägnantester Weise hervorgerufen werden.

Die beiden von mir isolierten Keime, der *Colibacillus* und der *Bacillus diphtheriae*, stehen in dieser Hinsicht dem oben genannten nach. Der *Bacillus Eberth* pflegt niemals Darmblutung hervor-

zurufen. Sogar, wenn er in höchsten Dosen inokuliert worden war, gelang es mir nie, das Versuchstier zu töten.

Aus diesen Vergleichsversuchen darf man den Schluß formulieren, daß die beiden Keime bei Hunden eine hochgradige brechreizende und hämolytische Wirkung entfalten, welche jedoch gar nicht als spezifisch zu betrachten ist, weil die gleiche Wirkung gleichfalls mehr oder wenig hochgradig auch von andersartigen Keimen hervorgerufen wird.

Die makroskopische pathologisch-anatomische Untersuchung bei den durch die beiden von mir isolierten Keime sowie durch den *Proteus*, *Colibacillus*, *Diphtheriebacillus* in dem Hunde hervorgerufenen Infektionen und Intoxikationen zeigten in deutlichster Weise, daß in den durch *Proteus* und *Colibacillus* hervorgerufenen Prozessen die Blutungen, bei den durch meine beiden Keime und durch den *Diphtheriebacillus* verursachten Infektion und Intoxikation Degenerationsveränderungen vorwiegen.

In diesen beiden Fällen handelt es sich mehr um Intoxikation als um Infektion.

Während dies für den *Diphtheriebacillus* bei Menschen und Versuchstieren die Regel ist, ist es mir bei dem Hunde nicht gelungen, sogar nach Inokulation großer Mengen lebender Kulturen der beiden in Rede stehenden Keime, eine üppige Vermehrung der spezifischen Bakterien nachzuweisen; im Gegenteil sind dabei die sekundären Infektionen vorwiegend, wie es übrigens bei den Gelbfieberkranken der Fall ist.

Durch Inokulation des Virus oder des Toxins in den Hund habe ich immer einen krankhaften Zustand hervorrufen können, welcher der Invasionsperiode des Gelbfiebers des Menschen sehr ähnlich ist.

In dieser Periode kann die bakterioskopische und bakteriologische Untersuchung des Blutes positiv ausfallen, wenn die inokulierte Virusdosis hoch genug ist.

Nach dieser ersten Periode, welche gewöhnlich mehrere Stunden, gemäß der Virulenz oder der Toxizität des inokulierten Materials, andauert, kommt eine Intoxikationsperiode, bei welcher es selten gelingt, das Vorhandensein des inokulierten Keimes im Blute nachzuweisen, trotzdem die injizierte Dosis eine große war. In dieser Periode beginnt der Uebergang der Keime der sekundären Infektion ins Blut. Der Nachweis dieser Erscheinung, welche fast niemals bei der sorgfältigen bakteriologischen Untersuchung von Gelbfieberfällen vermißt wird, hat einen großen Wert; die Erforschung des Mechanismus dieser sekundären Infektionen — sei es bei den Gelbfieberkranken, sei es bei den Versuchen — ist unbedingt nötig, denn sie beherrscht das ganze Krankheitsbild des Gelbfiebers von der zweiten Periode bis zu Ende, namentlich aber bei den letal endenden Fällen.

Die vergleichende Forschung der sekundären Infektionen im Gelbfieber des Menschen und die experimentelle Erzeugung derselben in den Versuchstieren bildet eigentlich den Gegenstand einer zweiten Mitteilung, welche ich bald erscheinen lassen werde.

Die am schwersten von dem *Diphtherievirus* und von dem in den in Rede stehenden Kulturen vorhandenen *Virus* angegriffenen Organe sind die Leber und die Nieren.

Die in Betracht kommenden Toxine entfalten eine degenerative Wirkung, welche sogar stärker als die des *Diphtherievirus* ist, welches

letztere, wie uns durch die Versuche von Ehrlich und Flexner bekannt ist, eine hochgradige degenerierende Wirkung besitzt; ferner ist die erwähnte Wirkung der ersteren sehr ähnlich der einiger Pflanzengifte — wie des Abrin des Jequirity und des Ricin.

Diesen Unterschied, welcher makroskopisch sehr prägnant ist, habe ich in Fällen, wo der Prozeß eine Zeitlang andauerte, stets beobachtet. Die Leber des Versuchshundes nimmt dann die sehr charakteristische Beschaffenheit der sogenannten „gekochten Leber, totblaß oder lederfarbigen Leber“, an, wie sie fast konstant bei dem letal endenden Gelbfieber der Menschen zu beobachten ist.

Diese so hochgradige degenerative Wirkung der von mir isolierten Keime muß als echte spezifische gelten, und dies sowohl bezüglich der Intensität als der Schnelligkeit ihres Auftretens.

Bei einem mit einer stärkeren als die minimale Letaldosis Kulturmenge inokulierten und 8 Stunden darauf gestorbenen Hunde gelang es mir, bei den mit dem Gefriermikrotom und dann mit Sudan III hydroalkoholischen Lösung behandelten Schnitten der Leber und der Nieren eine beträchtliche Menge von granulierten Fettzellen im Gefäßlumen nebst granulierten Fettylindern in den Nierentubula sowie Infiltrate mit großen oder kleinen Fetttropfen in dem Protoplasma der meisten Zellen zu beobachten, ein Befund, den ich weder durch das Diphtherietoxin noch mit anderen Bakterien erhalten habe.

Zur Vervollständigung der Zusammenfassung meiner Versuche über die pathogene Wirkung des *Bacillus icteroides* möchte ich hier noch bemerken, daß die Inokulationen mit defibriniertem amaryllischen Blute in die Venen von 2 Hunden und 2 Kaninchen in Mengen von 6 resp. 3 ccm keine nennenswerten Wirkungen hervorriefen.

Dies hängt von dem relativen Widerstande, welcher von den Versuchstieren den in Rede stehenden Keimen gegenüber entfaltet wird, ab, welche letzteren in dem von mir benutzten Blute in kleiner Menge vorhanden sind.

Schlußfolgerungen.

Aus meinen hier geschilderten Untersuchungen geht hervor, daß die beiden von mir in Gelbfieberkranken und -leichen isolierten Keime als zwei Exemplare des *Bacillus icteroides* Sanarelli zu betrachten sind.

Was nun die Spezifität dieses Keimes betrifft, so können wir folgende Schlüsse ableiten:

Der *Bacillus icteroides* bildet eine scharf charakterisierte Bakterienart.

Die Anwesenheit des *Bacillus icteroides* in den Gelbfieberkranken oder -leichen kann durch dazu geeignete Untersuchungsmittel nachgewiesen werden.

In den Gelbfieberkranken kann der Nachweis des *Bacillus icteroides* fehlen, weil derselbe sich in denselben nicht intensiv vermehrt; man sieht in diesen Fällen, was bei der Untersuchung des Typhusbacillus im Blute der Typhuspatienten vorzukommen pflegt.

Der *Bacillus icteroides* wurde im Blute der Gelbfieberkranken nicht allein in der präagonischen Periode mit andersartigen Keimen vergesellschaftet, sondern auch in reinem Zustande in gutartigen Fällen nachgewiesen, und in diesen letzteren konnte dem *Bacillus* nicht die Bedeutung eines Erregers sekundärer Infektion, der vom Darmkanal eingewandert ist, zugeschrieben werden.

Die Differentialdiagnose des *Bacillus icteroides* gegenüber anderen Mikroorganismen, die mit ihm verwechselt werden könnten, gründet sich hauptsächlich auf zwei wesentliche, durchaus individuelle Merkmale: 1) auf die spezifische Empfindlichkeit den Bakterioagglutininen und der sensibilisierenden Substanz gegenüber, welche in dem anti-amaryllischen Serum enthalten sind, und 2) die steatogene Wirkung auf das Protoplasma der Leberzellen, insbesondere bei der experimentellen, bei dem Hunde ausgeführten Inokulation.

Die übrigen Bakteriengifte besitzen kein so starkes Degeneration bewirkendes Vermögen auf das Zellenprotoplasma wie das Icteroides-Toxin, welches somit die charakteristische Veränderung des Menschen-gelbfiebers erzeugt.

Das Blutserum der mit Gelbfieber behafteten Patienten und derjenigen, die die Erkrankung überstanden haben, entfaltet nicht immer eine sehr prägnante agglutinierende und sensibilisierende Wirkung auf den *Bacillus icteroides*.

Diese Erscheinung wird bei zwei außerordentlich toxischen Erkrankungen beobachtet, nämlich beim Tetanus und der Diphtherie.

Der Nachweis des genau charakterisierten *Bacillus icteroides* ist bisher weder in Leichen noch in an anderen Infektionen leidenden Patienten, noch in der Umgebung der Länder, wo das Gelbfieber endemisch ist, vermißt worden.

Das negative Resultat, welches ich stets bei den Nachweisversuchen des *Bacillus icteroides* in an andersartigen Infektionen leidenden Patienten erhielt, hat den größten Wert betreffs der Fälle von schwerem Ikterus.

Es ist wohl bekannt, daß zwei Krankheiten, die in den Tropen ziemlich häufig vorkommen — trotzdem, wie es scheint, dieselben nicht zwei der pathogenetischen tropikal Flora ausschließlich zugehörnde Erkrankungsformen bilden —, die *Febria biliosa gravis* und der *Icterus gravis*, zuweilen Schwierigkeiten, Unbestimmtheiten etc. bei der Feststellung der Differentialdiagnose des Gelbfiebers bereitet haben. Und tatsächlich hat in älterer Zeit mancher Forscher das biliöse hämorrhagische Fieber als Gelbfieber der Akklimatisierten betrachten wollen.

Wenn einerseits die epidemiologischen, klinischen und pathologisch-anatomischen Befunde die wichtige Unterscheidung dieser 3 Erkrankungen bestimmen lassen, so geht andererseits aus den Erfahrungen hervor, daß in besonderen Verhältnissen sogar ein fleißiger, geschulter Beobachter in Zweifel geraten kann bei der Feststellung der Differentialdiagnose zwischen dem Gelbfieber und den beiden anderen genannten Krankheiten.

Ich möchte gerade auf die Beständigkeit aufmerksam machen, womit das Resultat der bakteriologischen Untersuchung, die sich auf die ganz verschiedene klinische Symptomatologie und auf die pathologisch-anatomischen Befunde gründende Differentialdiagnose stützt, sich bestätigt hat.

Endlich, wenn der *Bacillus icteroides* als banaler Keim betrachtet wird, dann muß man noch den innigen Mechanismus auffinden, wodurch diese Bakterie ausschließlich bei dem Gelbfieber die Widerstandsfähigkeit des Organismus besiegt, ihn besetzt und die Intoxikation hervorruft.

Der Nachweis solcher Tatsachen stimmt gar nicht mit den vermuteten, in der letzten Zeit von Reed und Carroll auf Cuba erhal-

tenen Resultaten überein, welche Untersuchungen die Lösung dieser wichtigen Frage der Tropenpathologie in ein durchaus neues Gebiet, d. h. der ultra-visiblen Keime übertragen würden; ein neues Gebiet, ein neuer Forschungsweg, die von Loeffler im Jahre 1898 zuerst angezeigt worden waren durch die Erforschung des apthösen Rinderfiebers, und welche sodann von Nocard und Roux (Peripneumonie der Rinder), von Sanarelli (Myxödem der Kaninchen) und von Centanni (Vogelpest) verfolgt worden sind.

Nachdruck verboten.

Antwort auf die Bemerkungen von Herrn Dr. Alfred Wolff in seiner Abhandlung „Die Differentialdiagnose des Typhusbacillus vom Bacterium coli¹⁾ auf Grund der Säurebildung“,

betreffend die von mir angestellten Versuche über „biochemische und differentialdiagnostische Untersuchungen einiger Bakterien mittels Phenolphthaleinnährböden“²⁾.

Von Dr. **Rudolf Zielleczky.**

Von einer Studienreise zurückgekehrt, ist es mir erst jetzt möglich, infolge Aufforderung des Prof. Dr. Kasperek, in dessen Institute meine biochemischen Untersuchungen mittels Phenolphthalein von mir durchgeführt wurden, zu den auf meine Arbeit sich beziehenden Bemerkungen von Dr. Alfred Wolff folgende Aufklärung zu geben:

In Uebereinstimmung mit den in meiner Arbeit angeführten Resultaten bemerkt Herr Wolff auf p. 646 im Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXXIII. 1903. No. 8 zu meiner Tabelle folgendes:

„Es kann gar nicht geleugnet werden, daß oftmals mit Hilfe der Säurebildung eine Diagnose gestellt werden kann, wie berechtigt es jedoch von mir war, die Methode zu differentialdiagnostischen Zwecken abzulehnen, er gibt sich z. B. aus Tabelle 6 von Zielleczky selbst.

Kultur		7	9	11	15	24 Std.
A. Coli II.	Nach 5	ent-	stark	Zunahme	nur noch ganz	ganz entfärbt
5 ccm Bouillon	unver-	färbt	entfärbt	der Entfä-	schwach rosa ge-	
	ändert			rbung	färbt und trüb	
B. Typhus II.	do.	etwas	Entfärbung	Entfärbung	leicht entfärbt und	ganz entfärbt
5 ccm Bouillon		beller	nimmt zu	nimmt zu	klar	und klar

Ich sehe darin eine große Parallelität beider Säurebildungen, wie ich sie selbst mehrmals beobachtete und die durch eine etwas eigenartige Nomenklatur von Z. verdeckt wird. Es ist sonst nicht zu verstehen, wie die Bouillon nach 7 Stunden entfärbt, nach 9 Stunden stark entfärbt, nach 15 Stunden nur noch ganz schwach rosa sein soll, nachdem inzwischen die „Entfärbung“ zugenommen hatte.“

Wir sehen ein, daß hier die Nomenklatur etwas unklar ist, und nach der Ueberprüfung unserer früheren Protokolle und der Versuche

1) Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXXIII. 1903. No. 8. p. 646.

2) Erschienen unter diesem Titel im Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXII. 1902. No. 10.

gelangen wir dazu, daß es selbstredend empfehlenswerter wäre, wenn statt der Ausdrücke „entfärbt, stark entfärbt, Zunahme der Entfärbung, nur noch ganz schwach rosa gefärbt“ die Farbenänderung als hell-rosarot, noch heller, gelb mit Rosaanflug, gelb mit ganz zartem Rosaanflug bezeichnet wäre.

Daneben wäre noch zu bemerken, daß die Berücksichtigung der Veränderung zwischen der 5. und 6. und 6. und 7. Stunde viel mehr zur Klarheit beigetragen hätte. Allein da es sich in der Tabelle VI um andere Versuche als um die Differenzierung von Typhus und Coli handelte, nämlich um die Menge der Säurebildung in Mischkulturen von Coli und Typhus, schenkten wir der Bezeichnung der Farbenänderung in dieser Tabelle nicht jene Genauigkeit, wie es in den vorherigen geschehen war.

Es ist auch selbstverständlich, daß die Säuredifferenzierungsmethoden, nachdem sie — wie Wolff treffend bemerkt — auf rein quantitativen und nicht auf qualitativen Verhältnissen beruhen, nicht jene Sicherheit bieten wie das Pfeiffersche Phänomen und die spezifische Agglutination.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Ein-sendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Inhalt.

- | | |
|---|--|
| <p>Bail, Oskar, und Pettersson, Alfred, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. VII., p. 445.</p> <p>Bandi, Ivo, Beitrag zur bakteriologischen Erforschung des Gelbfiebers. Eine neue Methode für den raschen Nachweis des Bacillus icteroides Sanarelli, p. 463.</p> <p>Bertarelli, E., Ueber einen ziemlich seltenen Tuberkelsputumbefund, p. 411.</p> <p>Bosc, F. J., Les Epithéliomas parasitaires. La clavelée et l'Epithélioma claveloux, p. 413.</p> <p>Doerr, Robert, Beitrag zum Studium des Dysenteriebacillus, p. 385.</p> <p>Ghon, Anton u. Sachs, Milan, Beiträge zur Kenntnis der anaeroben Bakterien des Menschen. (Forts.), p. 398.</p> <p>Lambotte, U., Contribution à l'étude de l'origine de l'alexine bactéricide, p. 453.</p> <p>Lipstein, A., Ueber Immunisierung mit Diphtheriebacillen, p. 421.</p> | <p>Müller, Paul Theodor, Zur Theorie der natürlichen antibakteriellen Immunität, p. 459.</p> <p>Pröschner, Ueber die künstliche Immunität gegen Staphylokokken, p. 437.</p> <p>Wiener, E., Weitere Bemerkungen zur Entstehung von Ratteneizootien, p. 406.</p> <p>Zangger, H., Deutungsversuch der Eigenschaften und Wirkungsweise der Immunkörper, p. 428.</p> <p>Ziellescky, Rudolf, Antwort auf die Bemerkungen von Herrn Dr. Alfred Wolff in seiner Abhandlung „Die Differentialdiagnose des Typhusbacillus vom Bacterium coli auf Grund der Säurebildung“, betreffend die von mir angestellten Versuche über „biochemische und differentialdiagnostische Untersuchungen einiger Bakterien mittels Phenolphthaleinnährböden, p. 479“.</p> |
|---|--|

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen.

[Aus dem pathologisch-anatomischen Institute in Wien
(Prof. Dr. A. Weichselbaum).]

II. Zur Aetiologie des Gasbrandes.

Von Dr. Anton Ghon und Dr. Milan Sachs.

(Erster Teil.)

Mit 3 Tafeln.

(Fortsetzung.)

M 28, 285 g, am 21. Dezember 1903 intraperitoneal 2,5 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur.

Die Injektion wurde mit großer Vorsicht vorgenommen, es gelangte anscheinend nichts von der injizierten Flüssigkeit in das subkutane Bindegewebe der Bauchhaut.

Tod zwischen 10 und 21 Stunden.

Sektion am 22. Dezember, $\frac{1}{2}$ 1 Uhr mittags (in der Zwischenzeit am Eis): In der linken Inguinalbeuge (Injektionsseite) kirschfarbenes Oedem in geringer Ausdehnung. Das subkutane Gewebe der Bauchwand, namentlich der linken Flanke, gleichfalls kirschfarbenähnlich gefärbt und etwas feuchter. Das Abdomen aufgetrieben. In der Bauchhöhle in spärlicher Menge freie, trübe, schwach rötlich gefärbte Flüssigkeit. Das Peritoneum parietale kirschfarben, das der linken Seite dunkler. Die Serosa des Darmes stärker gerötet, namentlich die des Magens, Dünndarmes sowie des Uterus. Auf dem Magen und der unteren Fläche des linken Leberlappens zarte Fibrinflocken. Leber wie gekocht, morsch. Milz klein, blaßbraun. Nebennieren graugelb. Nieren graurötlich-braun, weich. Lungen blaß. Herz gefüllt.

Deckglaspräparate: peritoneale Flüssigkeit: Schmale, meist gerade Stäbchen, sehr häufig in langen gegliederten und ungliederten Fäden, vorwiegend Gram-negativ, seltener mit Uebergangsfärbung und Gram-positiv. Gram-negative, schlecht tingierte, besonders dünne Formen (Degenerationsformen?).

Kulturen: a) peritoneale Flüssigkeit: Aërob: Steril. Anaërob: mäßig reichliches Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Herzblut: Anaërob: steril.

Histologischer Befund:

1) Leber. Die Kerne der Leberzellen im allgemeinen gut färbbar, Konturen erhalten. Gefäße gut gefüllt. Auf der Oberfläche stellenweise eine zarte Exsudatschicht sichtbar, die fast ausschließlich aus polynukleären Leukocyten besteht.

2) Schnitt durch das Omentum mit anhaftendem Pankreas zeigt im letzteren keine besonderen Veränderungen. Das Netz jedoch erscheint an vielen Stellen vollständig durchsetzt von polynukleären Leukocyten, deren Kerne gut erhalten sind. Zwischen den Eiterzellen finden sich mehr oder weniger reichlich Gram-positive Bacillen, sehr häufig in längeren Fadenformen. Die Gefäße sind stark gefüllt, in ihnen keine Bakterien nachweisbar.

c) Bei intramuskulärer Infektion (hintere Extremität) zeigten die Muskeln und das interstitielle Bindegewebe an der Injektionsstelle und in der Umgebung neben mehr oder minder reichlicher Durchtränkung mit trüber, rötlicher Flüssigkeit meist ausgebreitete hämorrhagische Imbibition, das subkutane Bindegewebe der infizierten Extremität sowie der regionären Inguinalbeuge und der angrenzenden Bauchwandpartien ähnliche Beschaffenheit wie nach subkutaner Infektion. Gasbläschen waren im Bereiche der Infektionsstelle sowie im ödematös durchtränkten, subkutanen Gewebe in mehr oder minder reichlicher

Menge vorhanden oder fehlten in anderen Fällen. Der übrige Befund wich im allgemeinen nicht von dem bei subkutaner Infektion ab.

M 21, 570 g, am 30. Mai 1902 intramuskulär (linker Oberschenkel, hinten) 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 20.

Nach 14 Stunden der linke Oberschenkel stark geschwollen; deutliches Knistern. Tier schwer krank.

Tod des Tieres nach 21 Stunden.

Sektion, unmittelbar post mortem: linker Oberschenkel und seine Umgebung geschwollen. Deutliches Knistern am linken Oberschenkel und in der linken Flanke bis gegen die Mittellinie des Bauches hin. Haut im Bereiche dieser Veränderungen feucht und an der Außenseite des linken Oberschenkels (Injektionsstelle) an einer länglich geformten Stelle schwärzlich-rot. Diese Partie ist unregelmäßig begrenzt und setzt sich von der Umgebung scharf ab. Binde- und Fettgewebe der linken Inguinalbeuge reichlich durchtränkt von schmutzig kirschroter Flüssigkeit und abgehoben. Dieselbe Flüssigkeit durchtränkt auch das Unterhautbindegewebe der ganzen linken Extremität, des Genitale, der rechten hinteren Extremität, des ganzen Bauches, beider Flanken bis hinauf zum Rippenbogen und der hinteren linken Rückenpartie. Nur in der linken Flanke und an der linken hinteren Extremität kleinere Gasbläschen im durchtränkten Unterhautbindegewebe. Sonst keine Gasblasen. Muskulatur des Bauches glänzend, licht kirschrot. An der linken hinteren Extremität Gasbläschen im Bindegewebe zwischen den Muskelbündeln und unterhalb der Muskelscheiden. Bindegewebe und Muskelbündel feucht, letztere streckenweise blutig imbibiert. Von den Querschnitten durch die Muskel läßt sich reichlich rötliche, trübe Flüssigkeit abstreifen. Inguinale Lymphdrüsen kleinlinsengroß, dunkelrot, sukkulent, gefleckt, in hämorrhagisch-ödematöses Binde- und Fettgewebe eingehüllt. In der Bauchhöhle keine freie Flüssigkeit, vom Peritoneum parietale etwas rötlich gefärbte Flüssigkeit abstreifbar. Peritoneum feucht-glänzend, düster gerötet. Milz dunkelrot, klein. Leber braunrot. Nieren dunkelbraunrot. Nebennieren rötlich-gelb. In der Pleura des linken Lungenunterlappens einige Ekchymosen.

Deckglaspräparate: a) Subkutane Flüssigkeit: Mäßig viele Gram-positive Bacillen, spärliche geschwollene Formen, wenig Sporen.

b) Muskelsaft (linker Oberschenkel): Dieselben Bacillenformen wie bei a), nur etwas reichlicher.

In Jodpräparaten die Bacillen meist gleichmäßig lichtgelb, spärlich schwärzlich-braun gefleckt.

c) Peritoneum: Gram-positive Bacillen wie bei a) und b), auffallend lange gegliederte und ungegliederte Fäden.

Kulturen: a) Subkutane Flüssigkeit: Aërob: Steril. Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Herzblut: Anaërob: Steril.

Histologische Untersuchung:

1) Haut, Unterhautbindegewebe und Muskulatur des linken Oberschenkels von der Injektionsstelle: Epidermis im Stratum Malpighii streckenweise kernlos und dann zu einer gleichmäßig schmutzigrot gefärbten Schicht umgewandelt. Zellkerne der Haarschäfte und -bälge teils noch gut gefärbt, teils undeutlich oder ganz fehlend. Bindegewebe der Cutis über weite Strecken kernlos oder nur mit vereinzelt gut erhaltenen Kernen. Bindegewebsfasern mächtig gequollen. In den tieferen Schichten der Cutis und in den oberflächlichen Muskelschichten verschieden große, meist länglich gestaltete, aber unregelmäßig begrenzte, leere Hohlräume. Die Fasern der oberflächlichen Muskelschichten auseinandergedrängt durch gequollenes und teilweise kernloses Bindegewebe oder durch größere Zellhaufen, deren Kerne rundlich, polymorph oder länglich und meist sehr dicht gelagert sind, dabei intensiv gefärbt erscheinen. Dicht gelagerte Kernhaufen grenzen die oberflächliche Muskelschicht auch nach oben und unten zu ab. Sie setzen sich gleichfalls aus verschiedenen Formen zusammen, darunter auch vielen kleeblattähnlichen, manchmal bestehen sie aber fast ausschließlich aus langen oder langgezogenen Formen. Die Muskelfasern erscheinen homogen oder mehr oder weniger aufgefasert oder in verschiedenen große, unregelmäßige Stücke zerfallen. Die Querstreifung ist nur zum Teil erhalten.

Ähnliche Veränderungen finden sich auch in den tieferen Muskelschichten, die oft über weite Strecken kernlos sind und deren Fasern oft so starke Quellung zeigen, daß sie sich untereinander nur unscharf abgrenzen. Ab und zu trifft man auch in den tieferen Muskelschichten auf größere oder kleinere Hohlräume, sowie auf Zellhaufen, die meist aus multinukleären Leukocyten bestehen und mehr oder weniger ausgesprochenen Kernzerfall zeigen. Die Zellhaufen sind verschieden groß und in ihrer Umgebung erscheinen die Muskelfasern häufig nur mehr aus kleineren undeutlichen

Zerfallsstücken bestehend. Wo die Muskelfasern längs getroffen sind, zeigen die Zellenherde streifenförmige Anordnung. Im interstitiellen Binde- und Fettgewebe der tiefen Muskelschichten findet man reichlich feingekörnte, mit Eosin hellrot gefärbte Massen und verschiedene große Blutaustritte um die Gefäße, deren äußerste Schichten meist dieselben Veränderungen zeigen wie das umgebende Bindegewebe, deren Endothelien jedoch durchaus gut erhalten sind.

Bakterien lassen sich in allen Schichten in reichlicher Menge nachweisen, am reichlichsten im lockeren Bindegewebe zwischen den Muskelbündeln und -fasern. In enormen Mengen finden sie sich auch in der Umgebung der Zellenhaufen. Es sind durchweg Gram-positive Bacillen von verschiedener Länge, in kürzeren und auch längeren Fäden, oft angeschwollen oder wie gebläht aussehend. Keine sicheren Sporen.

2) Haut, Unterhautbindegewebe und Muskulatur der linken Flanke: Bindegewebsfasern der Cutis und Subcutis gequollen, über weite Strecken völlig kernlos. Auch die Muskulatur stellenweise kernlos, ihre Fasern in der schon wiederholt beschriebenen Weise mehr oder minder schwer verändert. Im interstitiellen Bindegewebe verschiedene große Hohlräume neben reichlichen, homogen oder feingekörnt aussehenden Massen, in den tieferen Schichten um die Gefäße kleinere Zellenherde, aus ein- oder mehrkernigen Leukocyten bestehend.

Reichlich Bacillen von demselben Aussehen und denselben färberischen Eigenschaften wie bei 1).

3) In der linken Inguinaldrüse kleinere Blutungen, die Follikel derselben dadurch teilweise zerstört. Nur in den äußeren Schichten der Kapsel finden sich meist längere Gram-positive Bacillen.

4) Unterlappen der linken Lunge: Im Lungengewebe unmittelbar unter der Pleura mehrere verschieden große Blutungsherde ohne Bakterien.

M 22, 445 g, am 30. Mai 1902 intramuskulär (linker Oberschenkel) 1 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 20.

Tod des Tieres nach 21 Stunden.

Sektion, 3 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis): Kein Knistern. Haut der linken Bauchseite und der linken hinteren Extremität ödematös. An der Außenseite des linken Oberschenkels die Haut in ca. kreuzergroßer Ausdehnung dunkel-schwarzrot. Von dieser Stelle aus zieht ein dunkelroter Streifen über die linke Inguinalbeuge und Flanke den Rippenbogen, scharf sich absetzend von der ödematösen, sonst aber weißlich-grau aussehenden Umgebung. Unterhautbinde- und Fettgewebe der linken hinteren Extremität, der linken Flanke und der linken Bauchseite, sowie beider Inguinalbeugen reichlich durchtränkt von fast dunkel-kirschroter Flüssigkeit, am reichlichsten in der linken Inguinalbeuge. Nirgends Gasblasen. Muskulatur des linken Oberschenkels stark durchfeuchtet und streckenweise blutig imbibiert. In der Bauchhöhle geringe Menge leicht hämorrhagisch aussehender Flüssigkeit. Zwischen den Darmschlingen Gasblasen. Peritoneum stark feucht, düster-rot. Milz klein, braun. Leber dunkelbraunrot. Nieren braungelb, Oberfläche zart granuliert. Nebennieren groß, rötlich. Lungen fleckig anthrakotisch.

Deckglaspräparate: a) Muskelsaft vom linken Oberschenkel: Mäßig viele Gram-positive Bacillen, meist kurz, spärlicher angeschwollene Formen, spärlich Sporen.

b) Subkutane Flüssigkeit: Sehr spärlich Gram-positive Bacillen wie bei a).

Kulturen: a) Subkutane Flüssigkeit: Aërob: Steril. Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Herzblut: Anaërob: Steril.

Histologische Untersuchung:

1) Haut und Unterhautbindegewebe aus der linken Flanken- gegend (mit blutigem Streifen): Rete und epidermale Gebilde der Haut gut erhalten, die Bindegewebsfasern der Cutis und Subcutis mächtig gequollen, stellenweise durch größere und kleinere Blutungsherde auseinandergedrängt, ihre Kerne jedoch gut gefärbt. In den tieferen Schichten werden die Fasern auch ziemlich reichlich meist polynukleäre Leukocyten. Im subkutanen Binde- und Fettgewebe homogen oder feingekörnt aussehende Massen, ebenso im interstitiellen Bindegewebe der oberflächlichen Muskelschichten. Im letzteren auch größere und kleinere Blutungen und mehr oder minder reichlich multinukleäre Leukocyten und einkernige Rundzellen. Die Muskelfasern selbst zeigen Quellung, Faserung und Zerfall. Auffallend häufig sieht man an Querschnitten der Muskelfasern, daß letztere bei Hämalaun-Eosinfärbung dunkel tingiert erscheinen, den Schlauch nicht vollkommen ausfüllen, sondern retrahiert sind und in dem dadurch entstandenen Zwischenraume eine homogen oder feingekörnt aussehende Masse zeigen.

Gram-positive Bacillen von dem Aussehen wie in den früheren Fällen finden sich in großer Menge im subkutanen Gewebe und zwischen den auseinandergedrängten Muskelfasern, zum Teil auch in den zerfallenen Muskelfasern selbst. Weniger zahlreich finden sie sich in der Cutis, vollständig fehlen sie im Bereiche der Blutungen.

2) Muskulatur des linken Oberschenkels aus der Umgebung der Injektionsstelle: Reichlich feingekörnt aussehende Massen zwischen den Muskelfasern neben verschiedenen großen Blutungsherden und Zellenhaufen, die aus multinukleären, vielfach Kernzerfall zeigenden Leukocyten bestehen. Besonders entwickelt sind diese Veränderungen in dem lockeren Bindegewebe zwischen den Muskelbündeln. Die solchen Zelleninfiltraten benachbarten Sehnen und Muskelfasern enthalten dann meist reichlichste Mengen dichtstehender Kerne, die in den Muskelfasern noch als solche polynukleäre Leukocyten erkennbar sind, in den Sehnen jedoch plattgedrückt und dadurch länglich erscheinen, auffallend dicht und meist in wellig angeordneten Reihen gelagert erscheinen. Auch in den Nervenästen des interstitiellen Bindegewebes findet man größere und kleinere Blutungen. Die Muskelfasern zeigen Quellung, Auffaserung und Zerfall, ihre Kerne sind jedoch meist gut erhalten.

Bakterien findet man vorwiegend in dem ödematös und entzündlich veränderten Bindegewebe zwischen den Muskelbündeln, in größeren Haufen in den Randpartien der Infiltrate. In den Muskelfasern selbst sind Bakterien nicht oder nur spärlich nachweisbar, in den Blutungsherden fehlen sie vollständig. Es sind Bacillen einer Art, Gram-positiv, häufig angeschwollen und vielfach in kürzeren Fäden. Keine sicheren Sporen.

3) Die Nieren zeigen keine besonderen Veränderungen. Bakterien fehlen.

4) In den Nebennieren findet man Blutungen im Zentrum. Bakterien nicht nachweisbar.

II. Kaninchen (= K).

Für Kaninchen war der *Bacillus* pathogen.

Auf subkutane Einverleibung des Virus reagierten in unseren Versuchen die Tiere nur mit lokalen Erscheinungen. Diese bestanden darin, daß die Injektionsstelle und ihre Umgebung zunächst mehr oder minder stark teigig anschwellt und sich fleischwasserähnlich färbt. Durch Punktion dieser ödematösen Schwellungen konnte man eine kleinere oder größere Menge röthlich gefärbter, dünner Flüssigkeit erhalten, die in verschieden reichlicher Menge ausschließlich den injizierten *Bacillus* enthielt.

Die Schwellung ging entweder ohne weitere Veränderungen vollständig zurück oder es trat Nekrose der Haut ein, worauf nach Abstoßung der nekrotischen Partien ein langsam heilendes Geschwür zurückblieb.

K 1, 1217 g, am 10. Mai 1902 subkutan (Bauch) 5 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 16, 2. Gen.

Nach 24 Stunden ziemlich starke, über Abdomen und Thorax sich erstreckende, teigige Anschwellung.

Nach 2×24 Stunden im Bereiche der Injektionsstelle eine ca. apfelgroße, tumorartige, an ihrer Kuppe fluktuierende Erhebung; die Randpartien derber infiltriert, wallartig, stark gerötet. Kein Knistern nachweisbar. Die Infiltration setzt sich noch ca. 5 cm nach abwärts über die Bauchwand fort. Sterile Punktion des fluktuierenden Teiles ergibt eine dünne, blutig tingierte Flüssigkeit.

Deckglaspräparate dieser Flüssigkeit: Mäßig zahlreich Gram-positive, meist schlanke, vereinzelt plumpere Bacillenformen von verschiedener Länge, manche angeschwollen; spärlich Gram-negative Formen, einzelne derselben auffallend schwach rot (Gram und Nachfärbung mit wässrigem Fuchsin). Im Jodpräparate lichtgelbe Färbung der Bacillen.

Kulturen davon: 1) Aërob: Steril.

2) Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

Nach 8 Tagen: An Stelle der fluktuierenden Erhebung der Bauchhaut mit der Infiltration befindet sich ein großer, unregelmäßig begrenzter Substanzverlust, am Grunde teils mit Eiter, teils mit eingetrocknetem Sekret belegt, mit wallartig verdickten Rändern.

Drei Wochen nach der Injektion ist der Substanzverlust sehr verkleinert, flach und granulierend, nach einer weiteren Woche ist er vernarbt. Gewicht des Tieres 1305 g.

K 2, 1140 g, am 22. Mai 1902 subkutan (Bauch) 2,5 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 16.

Innerhalb der ersten 24 Stunden tritt eine Anschwellung der Bauchhaut auf, die sich allmählich vergrößert.

36 Stunden nach der Injektion: Haut im Bereiche der Injektionsstelle intensiv

fleischrot verfärbt, die Anschwellung über eigroß, gleichmäßig teigig, Gasblasen nicht nachweisbar.

5 Tage nach der Injektion: Die Anschwellung vergrößert, die Haut zeigt in ihrem Bereiche zwei unregelmäßig begrenzte Parteen, die schwärzlich gefärbt sind, trocken aussehen (trockener Brand) und sich an den Rändern von der umgebenden Haut abzulösen beginnen. Punktion der Anschwellung ergibt einen Tropfen trüber Flüssigkeit.

Deckglaspräparate davon: In mäßiger Menge Gram-positive Bacillen verschiedener Länge, meist mittelstark oder dünner, spärlich ebensolche Gram-negative und Übergangsformen.

Kulturen: 1) Aërob: Steril.

2) Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

Die beschriebenen Schorfe stoßen sich im weiteren Verlaufe ab; es hinterbleiben entsprechend große, tiefe Geschwüre mit trockenem Grunde, mit etwas unterminierten Rändern, aus denen eine weißliche, schmierige Masse in geringer Menge auspreßbar ist. Die Geschwüre heilen langsam vollständig aus.

K 10, 950 g, am 30. Mai 1902 subkutan (am linken Ohre) 1 ccm 48-stündiger Zuckergelatinekultur von M 20.

Das Ohr wird ödematös, namentlich im Bereiche der Ohrwurzel, hängt herab. Bereits nach 3 Tagen beginnt die Schwellung des Ohres wieder abzunehmen, das Ohr erlangt normales Aussehen.

Gewicht 7 Tage nach der Injektion: 840 g.

Das Tier bleibt ohne weitere Krankheitssymptome.

Völlig reaktionslos blieb die an einigen Tieren ausgeführte intraperitoneale Infektion, während die intramuskuläre Einverleibung des Virus einmal eine rasch verlaufende lokale Affektion bewirkte.

K 5, 1200 g, intramuskulär in den linken Oberschenkel 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 20.

In den ersten 24 Stunden zunehmende Anschwellung des linken Oberschenkels, auf Druck in den tieferen Parteen deutliches Knistern. Nach weiteren 24 Stunden Anschwellung bereits geringer, Knistern jedoch noch nachweisbar. In den nächsten Tagen Rückgang der Anschwellung. Kein Knistern mehr. Gewicht des Tieres 1040 g.

Tier bleibt ohne weitere Erscheinungen am Leben.

Intravenöse Injektion des Bacillus wirkte einmal sogar tödlich. Dabei kam es zu ausgebreiteten lokalen Veränderungen, indem sich ein mächtiges hämorrhagisches, nur von spärlichen Gasblasen durchsetztes Oedem über Hals, Thorax und Abdomen entwickelte, welches augenscheinlich seinen Ursprung von der intravenösen Applikationsstelle, dem linken Ohre, nahm. Bemerkenswert waren dabei die ziemlich zahlreichen Blutungen der Haut und des Unterhautbindegewebes, sowie der Muskulatur. Diese lokalen Veränderungen dürften dadurch entstanden sein, daß beim Herausziehen der Nadel Infektionsmaterial auch unter die Haut gelangte. Auffallend ist nur, daß die zweifellos geringe Menge, die dafür in Betracht kommen konnte, schon ausreichte, die relativ schweren lokalen Veränderungen zu setzen. Ähnliches zeigten übrigens auch die intraperitonealen Infektionen bei Meerschweinchen, was von uns bereits an anderer Stelle erörtert wurde.

K 4, 1550 g, am 22. Mai 1902 intravenös (linkes Ohr, äußere Randvene) 3 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 16.

Nach 48 Stunden ist das Tier schwer krank. Das linke Ohr hängt herab, erscheint in toto bedeutend angeschwollen und fühlt sich gleichmäßig teigig an. An der äußeren Fläche in unmittelbarer Nähe der Injektionsstelle eine ca. linsengroße Blutblase, eine ebensolche, etwa bohnen große an der Innenfläche des Ohres nahe der Ohrwurzel. Letztere hebt sich von der ödematösen Umgebung sehr scharf ab, ist dunkelfleischfarben und zeigt an ihrer Kuppe eine ca. kleinlinsengroße Gasblase, die sich in dem flüssigen Inhalte der Hautblase bei Bewegungen des Ohres leicht verschiebt. Der Ohrwurzel zu ist die ödematöse Anschwellung stellenweise ziemlich scharf durch eine hämorrhagische, breitere Zone abgegrenzt.

Tod des Tieres 63 Stunden nach der Injektion.

Sektion, unmittelbar post mortem: Das linke Ohr zeigt die beschriebenen Ver-

änderungen, die Blutblase an der Innenseite des Ohres in der Zwischenzeit geplatzt, die Haut daselbst mit hämorrhagischer Flüssigkeit in geringer Menge bedeckt.

Das Unterhautbinde- und Fettgewebe im Bereiche des Halses und des Thorax sowie der oberen Bauchpartien ziemlich mächtig von hämorrhagischer Flüssigkeit und mehr oder weniger reichlich von kleinsten Blutungen, vereinzelt auch von kleinen Gasblasen durchsetzt. Die Blutungen sind am reichlichsten im Bereiche der unteren Brusthälfte und der oberen Bauchhälfte, betreffen daselbst auch die Muskulatur. Lymphdrüsen des Halses und der Achselhöhlen nicht merklich verändert.

Peritoneum blaß, feucht. Milz dunkelrot, etwas weicher, lang. Leber dunkelbraunrot. Nieren plump, weich, gelbbraun. Nebennieren blaß. Magen, Darm ohne Veränderungen.

Binde- und Fettgewebe des vorderen Mediastinums ödematös, von kleinsten Blutungen durchsetzt. Lungen blaß, ohne Hypostasen. An der Unterfläche des linken Unterlappens einzelne bis stecknadelkopfgroße, hellrote Blutungen, ebenso an den medialen Flächen beider Lungen, eine größere Blutung am oberen Rande des linken Unterlappens. Herz schlaff.

Deckglaspräparate: 1) Oedem der Bauchhaut: Reichlich meist Gram-positive Stäbchen, kürzer und länger, gleichmäßig mittelstark, vereinzelt angeschwollene Formen, mäßig viele Formen mit mittel- und polständigen Sporen, spärlich freie Sporen. Vereinzelt Gram-positive Bacillen von gleichem Aussehen. — Lebhaftige Eigenbewegung.

2) Oedem des linken Ohres: Das gleiche Bild, nur etwas weniger reichlich Bacillen und relativ zahlreicher Gram-negative Formen.

3) Milzsaft und 4) Herzblut: Keine Bakterien.

Kulturen: 1) Oedem des linken Ohres: a) Aërob: Steril. b) Anaërob: Wachstum (Reinkultur).

2) Herzblut: a) Aërob: Steril. b) Anaërob: Eine Kolonie des Bacillus.

3) Lunge, linker Unterlappen, Blutung: Anaërob: Steril.

4) Niere: Anaërob: Steril.

Histologischer Befund:

1) Schnitt durch das ganze Ohr mit Blutblase an der Außenseite (No. 21, Taf. III). An der äußeren Fläche die Hornschicht gelockert und teilweise abgehoben, Rete streckenweise kernlos, ebenso manche der Haarbälge und -schäfte. Im Bereiche der Blase die ganze Epidermis abgehoben, Rete fast durchweg kernlos. In der Blase eine homogene oder feinkörnige, rötliche Masse (Eosinfärbung). Bindegewebsfasern der Cutis fast durchaus kernlos oder nur stellenweise mit noch undeutlich erhaltenen Kernen, in den tieferen Partien durch reichliche homogene Massen auseinandergedrängt. Die Kerne der Gefäßendothelien in den oberen Cutisschichten meist noch gut gefärbt, undeutlicher die der Lymphgefäße, die meist stark erweitert und mit schwach rötlich tingierten, körnig aussehenden Massen erfüllt sind. Noch stärker erweitert die Lymphgefäße unmittelbar über dem Ohrknorpel, in ihnen teils rötlich, teils bläulich (Bakterien) gefärbte feinkörnige Massen, spärliche rote Blutkörperchen und längliche, oft spindelig aussehende Zellen und Zellkerne; letztere oft dicht aneinandergedrängt. In den Blutgefäßen teils gut gefärbte, teils wie ausgelaugt erscheinende rote Blutscheiben.

Der Ohrknorpel in seinen äußeren Schichten beiderseits wie aufgefasert, die Kerne der Knorpelzellen nur stellenweise noch gut erhalten, die Zellen sonst kernlos, oft wie von Vakuolen durchsetzt.

An der Innenfläche des Ohres im allgemeinen dieselben Veränderungen, nur ist das Oedem weniger hochgradig.

Bakterien in enormer Anzahl nachweisbar, vor allem am Blasengrunde und in der dem Knorpel anliegenden Bindegewebsschicht der Außenfläche. Sehr reichlich finden sie sich auch in den erweiterten Lymphgefäßen, oft dieselben vollständig ausfüllend, während sie in den Blutgefäßen nicht nachgewiesen werden können. Hingegen sieht man sie zahlreich in der Außenwand der Gefäße. Im Blaseninhalte sind sie wieder nur spärlich. Es sind Gram-positive Bacillen, meist kurz und wie angeschwollen mit endogenen Sporen. Auch in den äußeren Schichten des Ohrknorpels Bacillen.

2) Ein Durchschnitt durch das Ohr an seiner Wurzel zeigt im allgemeinen denselben Befund wie 1), nur findet man reichlicher leere Hohlräume in der Subcutis und ziemlich ausgebreitete Blutungen um den Knorpel. Die Muskeln zeigen Kernschwund, Auffaserung und Zerfall. Außerdem aber findet man vorzüglich im Bereiche der Blutungen in den aufgefaserten oberflächlichen Knorpelschichten und an einer Stelle in der Subcutis der Außenseite des Ohres mehr oder weniger reichlich angehäuften Kernreste und Kerne. Die Kerne zeigen verschiedene Form und sind vielfach auch gelappt.

Bakterien finden sich in großer Menge in ähnlicher Verteilung wie bei 1) und

von dem gleichen Aussehen, namentlich reichlich in der Umgebung der beschriebenen Kernhaufen.

3) Schnitte durch das Unterhautbindegewebe und die Muskulatur des Thorax. Im Bindegewebe der Subcutis und der Muskulatur reichlichst homogen oder feingekörnt aussehende, rötliche (Eosin)Massen. Ueber größere Strecken vollständiger Kernmangel, an anderen Stellen wieder Blutungen und mehr oder weniger reichlich Zellen, ein- und mehrkernige, daneben Kernreste, welche stellenweise zu größeren dichtgelagerten Haufen vereinigt sind. Die Muskelfasern teils homogen, teils aufgefasert oder zerfallen, mit Querstreifung und ohne solche, vielfach kernlos und zwar namentlich an jenen Stellen, welche die beschriebenen Anhäufungen der Kerne und Kernreste zeigen. Die Endothelien der Gefäße gut tingiert.

Bakterien im lockeren Bindegewebe und im Bereiche der kernlosen Muskelpartien in enormen Mengen von demselben Aussehen wie bei 1) und 2).

4) Bauchhaut mit oberflächlichen Muskelschichten: Rete, Haarbälge und -schäfte zeigen gut gefärbte Kerne. Bindegewebsfasern der Cutis gequollen, im Papillarteile die Kerne noch gut gefärbt. Subkutanes Bindegewebe mächtig gequollen und auseinandergedrängt durch homogen aussehende, rötliche (Eosin)Massen und kernlos. An vereinzelt Stellen dichte Anhäufungen von Kernresten sowie spärlichen ein- und mehrkernigen Zellen. Oberflächliche Muskelschichten auseinandergedrängt durch Oedemmassen, die Muskelfasern aufgefasert.

Bakterien spärlich im Papillarteile der Cutis, dagegen sehr reichlich in der Subcutis. Sie zeigen dasselbe Aussehen wie bei 1), 2) und 3).

5) Linker Lungenunterlappen mit Blutung: Der Randteil der Lunge hämorrhagisch infarziert. Alveolen und Septa vollständig von roten Blutkörperchen durchsetzt, letztere vielfach zerstört. In den Randpartien der Blutung findet man neben den roten Blutkörperchen mehr oder weniger reichlich homogene, rote (Eosin) Massen. In den Bronchien rote Blutkörperchen und die erwähnten rotgefärbten Massen.

Bakterien sind nicht nachweisbar.

6) Niere: Die Epithelzellen der Tubuli contorti undeutlich begrenzt, gequollen, ihre Kerne undeutlich, stellenweise auch ganz fehlend. In den Harnkanälchen nicht selten Blutzylinder oder homogene Cylinder. In den Glomerulis Blutungen, einzelne der Glomeruli dadurch zerstört und kernlos.

Keine Bakterien.

7) Leber blutreich, ohne sonstige Veränderungen.

Keine Bakterien.

8) Milz sehr blutreich und von kleineren Blutungen durchsetzt, die zum Teil auch in den Randpartien der Malpighischen Körperchen sichtbar sind. Stellenweise scholliges, braungelbes Pigment.

Keine Bakterien.

III. Weiße Mäuse (= Ms).

Auch für Mäuse war der Bacillus pathogen, und zwar sowohl bei subkutaner als auch bei intraperitonealer Einverleibung. 0,5 bis 1,0 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur bewirkte bei subkutaner Infektion innerhalb $19\frac{1}{2}$ - 35 Stunden den Tod der Tiere. Die Veränderungen bestanden in einer mehr oder weniger reichlichen seröshämorrhagischen Durchtränkung des subkutanen Binde- und Fettgewebes im weiten Umkreise der Injektionsstelle. Gasblasen konnten nicht nachgewiesen werden. Die inguinalen Lymphdrüsen, besonders die der Injektionsseite entsprechenden, erschienen meist geschwollen und hyperämisch. In den inneren Organen fanden sich bis auf Degeneration der parenchymatösen Organe keine konstanten Veränderungen.

Bei intraperitonealer Einverleibung des Bacillus fand sich im Peritonealraume der gefallen Tiere etwas leicht getrübe Flüssigkeit.

Ms 1, am 22. Mai 1902 subkutan (linke Bauchseite) 1 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 16.

Tod des Tieres nach $19\frac{1}{2}$ Stunden.

Sektion, unmittelbar post mortem: Bauchhaut der linken Inguinalgegend leicht vorgewölbt, feucht. Haut und Unterhautbindegewebe nicht abgehoben, von einer schwach-rötlichen Flüssigkeit in mäßiger Menge durchsetzt. Kein Gas. Die rötliche Flüssigkeit am reichlichsten in den Inguinalbeugen, namentlich in der linken, das die Inguinaldrüse umgebende Binde- und Fettgewebe von sulzigem Aussehen. Die Drüse selbst fast kleinlinsengroß, dunkelschwarzrot. Am Peritoneum keine Veränderungen.

Milz etwas größer, dunkelrot. Leber und Nieren gelbbraun. Nebennieren blaß. Lungen blaß. Herz gut gefüllt. Magen, Darm ohne Veränderungen.

Deckglaspräparate: a) Injektionsstelle: Reichlich Gram-positive Bacillen, kürzer und länger, spärlich angeschwollene Formen und kürzere, ungegliederte Fäden, mäßig viel endogene Sporen. Vereinzelt Uebergangs- und Gram-negative Formen.

Ziemlich rasche, schlängelnde Eigenbewegung.

a) Jodpräparat: Bacillen hellgelb, vereinzelt mehr oder weniger gleichmäßig braungelb.

b) Abstreifpräparat vom Peritoneum: Ziemlich reichlich Gram-positive Bacillen derselben Form und Größe wie von der Injektionsstelle.

Kulturen: 1) Aërob von der Injektionsstelle: Steril.

2) Anaërob von der Injektionsstelle und vom Herzblute: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

Histologischer Befund:

1) Bauchwand (linke Seite): Rete und Haarschäfte zeigen gut gefärbte Kerne. Die tieferen Schichten der Cutis sowie der Subcutis gelockert, ihre Bindegewebsfasern durch reichliche, streifig körnige und homogene, lichtrot gefärbte (Eosin)Massen auseinanderdrängt, die Kerne zum Teil undeutlich oder fehlend. Stellenweise größere oder kleinere Anhäufungen von polynukleären Leukocyten, die meist ausgesprochenen Kernzerfall zeigen. In den tieferen Muskelpartien die Muskelfasern teils der Länge nach aufgefaserter, teils der Quere nach zerfallen, teils völlig in Schollen zerlegt. Die Kerne fehlen hier streckenweise vollständig. Zwischen den Muskelfasern reichlich feinfaserig körnige oder homogene Massen, vereinzelt auch Anhäufungen von Zellkernen, welche vielfach Zerfall zeigen.

Nirgends Hohlräume, die Gasblasen entsprechen.

Bakterien reichlich vorhanden, am reichlichsten in der Subcutis, am spärlichsten in den obersten Schichten der Cutis. Sehr zahlreich finden sie sich auch in der Umgebung der Leukocytenansammlungen. Es sind Bacillen einer Art, Gram-positiv, vielfach in kürzeren Fäden, viele auch angeschwollen. Keine sicheren Sporen. Innerhalb der Muskel längere Fäden.

2) Milz blutreich und reichlich von körnigem und scholligem Pigment durchsetzt. Bakterien nicht nachweisbar.

M 3, am 22. Mai 1902 intraperitoneal 1 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 16.

Tod des Tieres innerhalb der ersten 13 Stunden.

Sektion, 10 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis): Das subkutane Bindegewebe der Bauchhaut und Muskulatur ohne Veränderungen. Peritoneum parietale und viscerales nicht gerötet, feucht; von demselben geringe Mengen leicht getrübt, von kleinen Gasblasen (?) durchsetzter Flüssigkeit abstreifbar. Milz nicht vergrößert. Leber braunrot. Nieren braungelb. Nebennieren und Lungen blaß.

Deckglaspräparate vom Peritoneum: Wenig zellige Elemente, keine Eiterkörperchen. Spärlich mittelstarke, kürzere und längere Bacillen, Gram-positiv, Uebergangsformen und Gram-negativ.

Kulturen: 1) Aërob vom Peritoneum: Steril.

2) Anaërob vom Peritoneum: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur), vom Herzblute steril. (Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Ueber ein akut wirkendes Bakterientoxin¹⁾.

[Aus dem staatl. serotherapeutischen Institute in Wien (Vorstand: Prof. R. Paltauf).]

Von Privatdozent Dr. **Rudolf Kraus**, Assistenten am Institute.

I.

Bei Untersuchungen über die Wirkungen der Bakteriohämolyse fand ich, daß nach intravenöser Injektion geringer Mengen einer hämolytisch wirkenden Kultur Tiere innerhalb weniger Minuten zu Grunde gingen.

1) Vortrag, gehalten am internat. hyg. Kongreß in Brüssel 1903.

Der giftbildende Mikroorganismus ist ein *Vibrio*, den Herr Prof. Paltauf auf sein Ansuchen um einen virulenten Cholera**vibrio** im Jahre 1899 durch die Freundlichkeit des Herrn Dr. Marmorek aus dem Institut Pasteur erhalten hatte. Dieser *Vibrio*, der entsprechend einer späteren Nachfrage als *Vibrio Naskin* bezeichnet war, konnte jedoch nicht als Cholera**vibrio** angesehen werden. Die mittels Agglutination erfolgte Differenzierung ergab, daß dieser *Vibrio* von einem Cholera**serum** (gewonnen mit einem Cholera**vibrio** Pfeiffer) nur in niedrigen Verdünnungen agglutiniert wird.

Das Immunerum agglutiniert zwar Cholera**vibrionen** verschiedener Herkunft bis zu einer Verdünnung von 1:20000; andere *Vibrionen* dagegen (Finkler-Prior, *Vibrio Deneke*, Metschnikoff, Danubicus, Elvers) werden von diesem Serum entweder gar nicht oder nur in Werten von 1:400 agglutiniert. Der *Vibrio Naskin* wurde ebenfalls bis zu einer Verdünnung von 1:400 agglutiniert, in den weiteren Verdünnungen von 1:800, 1:1000, 1:2000 zeigte sich keine Agglutination mehr. Die Versuche, den *Vibrio Naskin* mittels spezifischer Niederschläge näher zu bestimmen, ergaben mit der Agglutination gleichlautende Resultate. Das Cholera**serum**, welches in Filtraten von Cholera**kulturen** Präzipitate erzeugte, ließ in Filtraten der Kultur des *Vibrio Naskin* keine solchen entstehen. Da frühere Untersuchungen (1) gezeigt haben, daß die diagnostische Bedeutung der spezifischen Niederschläge gleich zu setzen sei der der Agglutination der Bakterien, unterliegt es wohl nach diesen Untersuchungen keinem Zweifel, daß der fragliche *Vibrio* kein Cholera**vibrio** sein könne und als eine selbständige *Vibrionenart* aufzufassen sei. Auch die nächste Probe auf die Verschiedenheit dieses *Vibrio* von Cholera**vibrionen** fiel positiv aus. Das Serum, gewonnen mit dem *Vibrio Naskin*, agglutinierte wohl bis 1:800 diesen *Vibrio*, nicht aber den Cholera**vibrio**.

Des weiteren lernten wir noch andere Eigenschaften kennen, die uns veranlassen, den *Vibrio* nicht als Cholera**vibrio** anzusehen. Der *Vibrio* produziert nämlich nach unseren früher mitgeteilten Untersuchungen (2) Hämolyse¹⁾, welche Eigenschaft Cholera**vibrionen** nach unseren Erfahrungen überhaupt nicht zukommt. Diese Hämolyse lassen sich mit Cholera**immunerum** nicht neutralisieren, wohl aber mit dem homologen Antivibrioserum. Zum Schlusse finden wir in Bouillonkulturen dieses *Vibrio* akut wirkende Toxine für Kaninchen, Meerschweinchen und andere Tiere, die wir bisher weder in Cholera**kulturen** noch in Kulturen anderer *Vibrionen* gefunden haben. Diese Momente veranlassen uns, anzunehmen, daß der *Vibrio Naskin* kein Cholera**vibrio** sei und als artverwandter *Vibrio* der Cholera**vibrionen** aufzufassen wäre.

Diese Differenzierung wurde absichtlich ausführlich wiedergegeben, um jedem weiteren Mißverständnis vorzubeugen.

Die Untersuchungen von Metschnikoff, Roux und Salimbeni (3) wollen, wie bekannt, ein lösliches Cholera**toxin** in bestimmten Cholera**kulturen** nachgewiesen haben. Mit diesem Toxin konnten die Autoren bei peritonealer Injektion großer Dosen Meerschweinchen in 6—10 Stunden töten. Mit sehr großen Dosen des Giftes oder mit konzentriertem Gifte töteten sie Meerschweinchen in einigen Minuten. Auch Ransom (4) konnte mit konzentriertem Cholera**gift** einen akuten Tod erzeugen.

1) Der in den früheren Arbeiten benutzte *Vibrio Paris* ist mit dem *Vibrio Naskin* identisch.

Da, wie gezeigt werden konnte, der *Vibrio Naskin* kein Cholera-vibrio ist, können auch die von den Autoren nachgewiesenen Cholera-toxine mit dem Gifte dieses *Vibrio* nicht identifiziert werden.

II.

Wie bereits eingangs erwähnt wurde, fand ich beim Studium der Wirkungsweise des Vibriohämolytins im Organismus, daß nach intravenöser Injektion von 1 und $\frac{1}{2}$ ccm einer Bouillonkultur des *Vibrio* Kaninchen innerhalb 10—30 Minuten zu Grunde gingen. Die Tiere zeigen sofort nach der Injektion beschleunigte Respiration und Herzfrequenz, Diarrhöen und gehen unter Lähmungserscheinungen zu Grunde. Die Obduktion der Tiere ergibt keine Anhaltspunkte für die Erklärung des akuten Todes. Das Blut ist, sofort nach dem Tode untersucht, flüssig und enthält kein Gerinnsel. Auch direkt darauf gerichtete Versuche bei Kaninchen, denen vorher Blutegelextrakt injiziert wurde und deren Blut nachher durch längere Zeit in vitro nicht gerinnt, zeigen, daß die Tiere ebenso akut zu Grunde gehen wie normale Kaninchen. Eine gerinnungsalterierende Wirkung des Giftes auf das Blut konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Auch konnte die Hämolyse als Ursache für den Tod durch direkte Versuche ausgeschlossen werden. Durch Versuche, die Herr Dr. Rothberger ausgeführt hatte und über die er ausführlich berichten wird, konnte festgestellt werden, daß der wahrscheinliche Angriffspunkt das Herz sei, welches nach Ablauf der Inkubation zusehends schlechter arbeitet und in starker Dilation stehen bleibt. Direkte Wirkungen des Giftes auf das Atemzentrum sind nicht nachweisbar. Die Atmung leidet bei beginnender Herzschwäche unter mangelhafter Blutzufuhr.

Bei der Analyse der Ursache der Giftwirkung konnte zunächst nachgewiesen werden, daß die bakterienfreien Filtrate ebenso akut giftig wirken wie die Bouillonkultur. Der Nachweis, daß die Gifte in Filtrate übergehen, gelang erst nach verschiedenen Versuchen, indem sich zeigt, daß verschiedene Filter (Pukal, Reichel, Chamberland) verschiedene Durchlässigkeit aufweisen. Durch Pukal-Filter geht das Gift nicht durch, dagegen sind Reichel-Filter und Chamberland-Filter für diese Gifte durchlässig. Allerdings erfahren die Gifte bei der Filtration eine Abschwächung, manchmal sogar um das 5—10-fache ihrer Giftigkeit.

Auch noch andere Versuche lehrten, daß die Giftigkeit der Bouillonkultur von einem gelösten Gifte herrühren dürfte und nicht den Bakterien selbst zukomme. Nach intraperitonealer Injektion von Bouillonkulturen (1 ccm) gehen Meerschweinchen in 24 Stunden zu Grunde, ohne daß es gelingt, aus dem Peritoneum und Herzblute Bakterien zu züchten. Nach intravenöser und intraperitonealer Injektion von Agarkulturen bleiben Kaninchen am Leben. Wir haben es hier also mit einem Mikroorganismus zu tun, der, gleich vielen anderen Bakterien, nicht infektiös, wohl aber toxisch, vermöge der giftigen Stoffwechselprodukte, wirkt. Die Giftigkeit der Kultur kommt einem Körper zu, der sich von den Bakterien trennen läßt und, wie weitere Versuche lehren, als eine toxinartige Substanz aufzufassen ist.

Die akute Wirkung bei Kaninchen ist nur nach intravenösen Injektionen zu beobachten, nach intraperitonealer oder subkutaner Injektion kann, je nach der injizierten Menge, der Tod erst nach 24 Stunden bis einigen Tagen auftreten.

Nach intravenöser Injektion kann man mit 1 ccm einer Bouillonkultur bei Kaninchen Tod innerhalb 5 Minuten bekommen, geringere Mengen wie 0,5 töten innerhalb 15 Minuten, noch geringere Dose, 0,3 ccm, in 1—3 Stunden. Die Giftigkeit der Kultur ist bereits am 4. Tage nachweisbar und hält ziemlich lange ohne Abschwächung an, so daß 1—2 Monate alte Kulturen manchmal sich noch als toxisch erwiesen haben. Eine Beobachtung, die gemacht wurde, würde dafür sprechen, daß eine Abschwächung in dem Sinne erfolgen dürfte, daß bei gleichbleibender tödlicher Dosis des Giftes die zeitliche Wirkung sich geändert hatte.

Die Giftwirkung der Kultur wird durch Erwärmen auf 58° zerstört, ebenso wird sie durch Alkohol, Chloroform, Karbolsäure, ja sogar durch Ammonsulfat geschädigt. Die Versuche, in welchen die Fällung des Giftes durch Ammonsulfat versucht wurde, zeigten, daß es wohl gelingt, das Gift mit Ammonsulfat zu fällen, doch sind hierbei große Verluste zu verzeichnen gewesen.

Als ein brauchbares Konservierungsmittel hat sich das Toluol erwiesen. Mittels Toluol gelingt es auch ohne Filtration, die Giftigkeit der Kultur durch Abtötung der Bakterien zu erhalten.

Außer für Kaninchen erweist sich das Gift bei intravenöser Injektion noch für Meerschweinchen, Hunde, Tauben giftig. Ebenso wie für Kaninchen, ist, wie bereits erwähnt wurde, der *Vibrio* auch für Meerschweinchen nicht infektiös; der nach intraperitonealer Injektion der Bouillonkultur erfolgte Tod ist bloß durch Toxine bedingt und nicht durch Bakterien. Andere Verhältnisse ließen sich bei Versuchen an Mäusen feststellen. Nach intraperitonealer Injektion des Giftes gehen die Mäuse innerhalb 24 Stunden zu Grunde. Nach Injektion der Bouillonkultur gehen die Mäuse nicht allein an der Intoxikation zu Grunde, sondern auch an der Infektion, indem im Peritoneum und Herzblute der *Vibrio* kulturell nachweisbar ist. Auch die Agarkultur allein erweist sich infektiös für Mäuse.

Noch darauf sei hingewiesen, daß die Untersuchungen, bei Cholera-vibrionen (verschiedener Herkunft) und auch bei Vibrionen (Metschnikoff, Danubicus, Finkler-Prior) akute Toxine nachzuweisen, resultatlos verlaufen sind. Nach dem eben Mitgeteilten steht es fest, daß der *Vibrio* Naskin neben dem spezifischen Hämolyisin noch ein akut tödliches Gift für verschiedene Tiere produziert. Die Bakterien selbst sind für Kaninchen und Meerschweinchen weder toxisch noch infektiös. Das Gift ist ein Sekret der Bakterien analog dem Diphtherie- und Tetanustoxin. Im folgenden wird durch den Nachweis eines Antitoxins die Toxinnatur dieses Giftes sichergestellt.

III.

Untersuchungen, die eine giftneutralisierende Eigenschaft normaler Tiersera (Ziege, Pferd, Kaninchen) ermitteln sollten, haben ergeben, daß das Gift durch normales Serum nicht sofort neutralisiert wird. Mischt man beispielsweise 1 ccm normales Ziegenserum mit der tödlichen Giftdosis und injiziert das Gemisch sofort intravenös Kaninchen, so gehen die Tiere ebenso zu Grunde, wie durch das Gift allein. Nimmt man jedoch statt des normalen Ziegensersums das Serum einer mit dem Vibriotoxin durch längere Zeit subkutan immunisierten Ziege und injiziert das Gemisch sofort intravenös Kaninchen, so bleiben die Tiere am Leben. Das Serum vermag

sogar in Mengen von 0,05 ccm das Gift sofort zu neutralisieren. Diesem Serum kommt aber nicht nur die neutralisierende Eigenschaft *in vitro* zu, sondern es vermag auch kurativ zu wirken, wie folgender Versuch zeigt.

1 ccm Gift + 0,05 Serum sofort intravenös	Kaninchen lebt
1 " " intravenös sofort	danach Serum (1 ccm) "
1 " " " nach 5 Min. "	" (2 ") " "
1 " " " " 10 " intraven. "	(1 ") † " nach 10 Min.
1 " " " " 15 " " "	(3 ") † " 10 "
Kontrolle 1 ccm Gift intravenös	† " 25 "

Es geht daraus hervor, daß das Immenserum das bereits im Organismus befindliche Gift zu neutralisieren vermag. Daß schon 10 Minuten nach der Giftinjektion die Grenze der Wirksamkeit des Serums erreicht ist, wird ja bei der akuten Wirkung des Giftes nicht merkwürdig erscheinen. Erinnern wir uns nur an die Versuche von Heymans (5), Dönitz (6) und an eigene Versuche (7), wie rasch die Gifte aus der Blutbahn verschwinden können und wie schwer es ist, sogar langsam wirkende, aber bereits verankerte Gifte noch zu neutralisieren, so wird die Unwirksamkeit selbst der größten Serumdosen bei dieser akut verlaufenden Vergiftung verständlich erscheinen. Ebenso wie von Ziegen, konnten wir auch von Kaninchen, die mit Vibriogift subkutan immunisiert wurden, ein Antitoxin gewinnen, welches die letale Dosis sofort *in vitro* zu neutralisieren vermochte. Das Serum des Kaninchens vor der Immunisierung war in Mengen von 1 ccm nicht im stande, das Toxin (letale Dosis) *in vitro* zu neutralisieren, wogegen 0,1 ccm des Immenserums desselben Tieres noch das Gift sofort nach Zusatz zerstörte.

IV.

Daß Immunkörper sich durch äußere Einflüsse verändern können, ist bekannt. Am geläufigsten ist uns die Erscheinung, daß Diphtherieantitoxine bei längerem Stehen im Werte abnehmen. Auch von den Agglutininen, Präzipitinen wissen wir, daß sie durch Luft, Licht, chemische Eingriffe, analog den Toxinen, abgebaut werden. Das Diphtherieantitoxin verliert seinen Wert und wird wahrscheinlich ganz zerstört. Die Agglutinine, Präzipitine verhalten sich, wie bekannt, ähnlich wie Toxine, indem nach Verlust der fallenden Gruppe die bindende Gruppe erhalten bleibt. Einer anderen Art des Abbaues begegnen wir bei dem eben besprochenen Antitoxin. Das Antitoxin ist im stande, das Toxin sowohl *in vitro* als auch im Organismus unschädlich zu machen. Wie Versuche lehren, genügt dieselbe Menge des Serums (Grenzwert), nicht nur um die 1-fach tödliche Giftdosis *in vitro* zu zerstören, sondern sie genügt auch für die Neutralisation des Giftes im Organismus bei getrennter, aber gleichzeitiger Einverleibung von Gift und Serum.

Bei derartigen Versuchen hat sich gezeigt, daß ein älteres Serum nicht mehr im stande war, in Mengen, in welchen das frische Immenserum im Organismus noch giftneutralisierend wirkte, das Gift zu zerstören. Auch *in vitro* verhielt sich dieses Serum insofern anders, als die gerade neutralisierende Dosis (0,05 ccm) bei sofortiger Einwirkung das Gift nicht zu zerstören vermochte. Es schien demnach, als ob das Serum in seinem Werte zurückgegangen wäre und abgeschwächt sei. Ein einfacher Versuch konnte aber zeigen, daß der Antitoxinwert des Serums allein sich nicht geändert haben konnte, sondern auch die Avidität des Antitoxins zum Gifte.

Das frische Immunserum neutralisiert sofort nach Mischung in vitro die tödliche Giftdosis im Werte von 0,05 ccm. Zur Neutralisation des Giftes nach längerer Einwirkung (1 Stunde) des Serums in vitro braucht man ebensoviel Serum, die geringere Dosis 0,01 z. B. neutralisiert das Gift selbst nach 1-stündiger Einwirkung nicht mehr. Das ältere Serum, welches in der Menge von 0,05 bei sofortiger Einwirkung das Gift nicht mehr zu neutralisieren im stande ist, zerstört aber das Gift nach 1-stündiger Einwirkung in vitro genau in derselben Menge. Die Fähigkeit, das Gift auch bei sofortiger Einwirkung zu schädigen, ist dem Immunserum jedoch nicht vollständig verloren gegangen, da größere Dosen (0,1) die sofortige Neutralisation bewirken. Trotzdem der neutralisierende Wert des Serums, wie wir sehen (bei längerer Einwirkung auf das Gift), unverändert geblieben ist, hat sich das Antitoxin doch in dem Sinne geändert, daß es nicht mehr im stande ist, in derselben Menge, wie frisches Immunserum, das Gift sofort zu neutralisieren. Die Erklärung dafür ist vielleicht durch die Annahme gegeben, daß die Avidität des Antitoxins eine Aenderung, eine Abnahme erfahren hat. Auch der folgende Versuch dürfte im selben Sinne zu erklären sein. Das Serum eines immunisierten Bockes neutralisiert das Gift nicht nur in vitro, sondern auch im Organismus (0,2 ccm) bei getrennter und sofortiger Injektion von Gift und Serum. Dieser Bock wird durch fast $1\frac{1}{2}$ Monate nicht injiziert. Nachdem dann ein frischer Aderlaß gemacht wurde, zeigte sich, daß das frische Serum in Mengen von 1 ccm nicht im stande war, bei getrennter Injektion das Gift zu neutralisieren, wohl aber vermochte das Serum in Mengen von 0,05 ccm erst nach $\frac{3}{4}$ -stündiger Einwirkung das Gift zu neutralisieren. Ohne daß der Wert des Antitoxins für den vitro-Versuch sich geändert hätte, hat dieses Antitoxin (gewonnen längere Zeit nach der letzten Giftinjektion) eine Aenderung in dem Sinne erfahren, als es nicht mehr im stande ist, Gift so rasch zu neutralisieren, wie ein frisches, bald nach der Injektion gewonnenes Antitoxin.

Es muß demnach auch im Organismus das Antitoxin denselben Veränderungen unterworfen sein wie in vitro. Es ist nicht unmöglich, daß die bekannte Abschwächung der Immunkörper im aktiv immunisierten Tiere in der Weise zu erklären sein dürfte, daß die Avidität erst abnimmt und dann erst die Wertigkeit zurückgeht.

Durch diese Aenderung des Antitoxins im Sinne einer Aviditätsabnahme gewinnt das Immunserum dieselben Eigenschaften, wie sie eventuell einem normalen Serum zukommen. Wie nämlich in den weiteren Untersuchungen gezeigt wird, besitzt auch normales Serum bestimmter Tiere die Fähigkeit, das Gift zu neutralisieren.

V.

Daß das Serum gesunder Tiere Antikörper enthält, ist genügend bekannt. Wissen wir doch, daß Diphtherieantitoxin, Antihämolsine, Ambozeptoren im Serum gesunder Tiere nachweisbar sein können. Vorderhand nehmen wir von diesen normalerweise vorhandenen Antikörpern an, daß sie nur quantitativ und nicht qualitativ verschieden sind. In einer anderen Arbeit (7) haben wir eingehende diesbezügliche Untersuchungen angestellt und konnten zeigen, daß das normale Antihämolsin genau so wie das Immunantihämolsin wirke. Bei der Prüfung normaler Tiersera auf antitoxische Eigenschaften ergab sich im allgemeinen, daß

die Sera verschiedener Tiere wohl im stande sind, das Vibriogift zu neutralisieren, jedoch nur nach längerer Einwirkung. Das Serum gesunder Ziegen ist, selbst in Mengen von 1 ccm, nicht im stande, die tödliche Giftdosis bei getrennter Injektion und sofort nach der Mischung in vitro zu neutralisieren. Wohl aber gelingt die Neutralisation des Giftes nach 1-stündiger Einwirkung bei 37° selbst geringer Mengen (0,05 ccm) des normalen Serums.

Dieser Versuch wurde vielfach wiederholt und immer wieder ergab sich, daß normale Sera nur dann giftzerstörend gewirkt haben, wenn sie längere Zeit in vitro eingewirkt hatten, und daß selbst große Dosen ohne Einfluß blieben, wenn das Serum nur kurz einwirken konnte. Der neutralisierende Grenzwert war bei einigen Ziegen zu verschiedener Jahreszeit untersucht, fast immer gleich, indem zumeist 0,05 ccm noch wirken. Auch das normale Pferdeserum enthält ein Antitoxin gegen das akute Gift, welches ebenfalls erst nach längerer Einwirkung das Gift neutralisiert. Große Dosen (5 ccm) vermochten bei getrennter aber gleichzeitiger Injektion die Giftwirkung nicht hintanzuhalten und auch in vitro vermögen 2 ccm des Serums nicht das Gift sofort zu neutralisieren. Erst nach 1-stündiger Einwirkung in vitro gelingt es in den meisten Fällen und da schon mit 0,1 und 0,05 ccm Serum, die tödliche Dosis auszugleichen. Daß es manchmal noch längere Zeit zur Neutralisation des Giftes bedarf als 1 Stunde, ergibt sich aus folgendem Versuche.

0,1 ccm Ser. (norm. Pferdes.)	+ 1 ccm Gift nach 5 Min.	bei 37° intravenös	Kaninchen	† n. 50 Min.
0,05 " " " "	+ 1 " " "	15 " "	37° " "	† " 1 Std.
0,05 " " " "	+ 1 " " "	1 Std. "	37° " "	† " 1 "
0,05 " " " "	+ 1 " " "	4 Stdn. "	37° " "	lebt "

Im Serum der Kaninchen und Schweine ist es nicht gelungen, ein physiologisches Antitoxin nachzuweisen. Die Untersuchungen mit dem Serum der Schweine zeigten gleichzeitig, daß das akute Toxin von dem Vibriolysin verschieden sein muß. Im normalen Schweineserum konnten wir (Kraus und Clairmont) Antivibriolysine nachweisen; trotzdem läßt dasselbe Serum das Toxin unbeeinflusst. Ein entgegengesetztes Verhalten bietet das normale Ziegenserum, indem dasselbe das Hämolyysin nicht neutralisiert, wohl aber das akute Toxin. Ganz gleich verhält sich auch normales Pferdeserum, welches Vibriolysin zu paralisieren nicht im stande war, wohl aber das Toxin. Nebenbei sei noch erwähnt, daß Immunserum von Pferden (Diphtherieantitoxin, Choleraimmunserum) nicht anders gewirkt hatten, als normales Serum. Diese Versuche, zusammengehalten mit den vorangehenden (mit Immunserum), sprechen dafür, daß das normale Antitoxin sich in seiner Avidität zum Gifte vom Immunantitoxin unterscheidet. Das Immunantitoxin (Ziege, Kaninchen) neutralisiert sofort nach Zusatz das Gift, wogegen das normale Antitoxin längere Zeit zur Neutralisation bedarf. Eine auffallende Erscheinung ist nur, daß auch vom Immunantitoxin (Ziegemann) dieselbe Menge zur Neutralisation notwendig ist, wie vom normalen Serum vor der Immunisierung. Ein normales Ziegenserum neutralisiert beispielsweise nach 1-stündiger Einwirkung die letale Giftdosis in der Menge von 0,1, sowie das Immunantitoxin bei sofortiger Einwirkung in vitro.

Versuch.

0,1 ccm Ziegenser. vor d. Immunisierg. + 0,5 Gift n. 1 Std. bei 37° intrav. Kan. lebt
 0,05 „ „ + 0,5 Gift †

Die Ziege wird vom 16. April bis 9. Juni immunisiert und bekommt 62 ccm Gift. 7 Tage nach der letzten Injektion erfolgt der Aderlaß.

0,1 ccm Serum + 1,0 Gift sofort intravenös Kaninchen lebt
 0,1 „ „ + 1,0 „ „ „ „ „ †

Diese auffallende Tatsache, der wir noch in weiteren Versuchen (Ziegen) begegnet sind, würde dahin gedeutet werden können, daß das normale Antitoxin (das physiologischerweise produziert wird) bei der Immunisierung nur eine qualitative Aenderung erfährt (indem es avider wird), aber nicht in größerer Menge produziert wird.

VI.

Daß die Vibriokulturen zweierlei funktionell verschiedene Gifte enthalten, geht aus dem Vorangehenden unzweifelhaft hervor. Neben dem Hämolysin läßt sich noch das akute Toxin bestimmt differenzieren. Das Toxin besteht aber, wie Versuche lehren, aus verschiedenen Giften, die nicht ihrer Funktion nach verschieden sind, sondern in der Giftigkeit für verschiedene Tierarten, indem neben dem Gifte für Kaninchen ein solches wahrscheinlich für Meerschweinchen, Mäuse etc. im Gesamtgifte enthalten sein dürfte. Daß eine solche Verschiedenheit des gleichen Giftes für verschiedene Tierarten besteht, konnte bereits Markl (8) in seiner Arbeit über Pesttoxine nachweisen. Markl zeigt, daß durch Erhitzung der Filtrate von Pestkulturen auf 70° die Giftigkeit für Mäuse verloren geht, während sie für Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen beibehalten bleibt. Auch Wechsberg (9) ist es in letzter Zeit gelungen, den Nachweis zu führen, daß ein bestimmtes Hämolysin vielerlei hämolytische Gifte für Blutkörperchen verschiedener Tiere enthalten dürfte. Der folgende Versuch spricht auch in dem Sinne, daß das akute Toxin vielleicht ein Gemenge vieler Gifte sein dürfte.

Versuch an Mäusen.

- a) 0,5 ccm normales Ziegenserum (enthält Antitoxin für Kaninchengift)
 0,4 „ „ „ + 0,2 Gift } 1 Stunde bei 37°, dann intraperitoneal
 0,3 „ „ „ + 0,2 „ } Mäusen. † in 24 Stunden
 0,2 „ „ „ + 0,2 „ }
 b) 0,2 „ Immunserum + 0,2 Gift } 1 Stunde bei 37° intraperitoneal, leben
 0,3 „ „ + 0,2 „ }
 0,5 „ „ + 0,2 „ }
 Kontrolle: 0,2 Gift intraperitoneal (2 Mäuse) † in 24 Stunden

Trotzdem das normale Ziegenserum das Gift für Kaninchen zu neutralisieren vermag, sehen wir hier ein vollkommenes Versagen des Serums selbst nach 1-stündiger Einwirkung. Nach dem Ausfalle des Versuches müssen wir annehmen, daß im Gesamtgifte ein Gift enthalten sein dürfte, welches für Mäuse toxisch ist und gegen welches im normalen Serum kein entsprechendes Antitoxin vorhanden sei. Durch Immunisierung gewinnt man, entsprechend der Vielheit der Gifte, ein Immunserum, in welchem auch ein Antitoxin gegen das Mäusegift enthalten ist.

VII.

Nach den Angaben von Calmette (10) soll Tetanusantitoxin, Lyssaserum das Schlangengift neutralisieren. Da einerseits diese Angaben keine weitere Nachprüfung in der Literatur gefunden haben und doch für die Auffassung der Spezifität der Immunsbstanzen wichtig sind, andererseits die akute Wirkung unseres Giftes an die Wirkung des Schlangengiftes erinnert, gingen wir daran, ähnliche Versuche mit dem Antivibriotoxin zu machen.

Zunächst wurde normales Ziegenserum geprüft, wobei sich ergab, daß es die tödliche Schlangengiftosis¹⁾, ja selbst in Mengen von 0,5 ccm Serum nach längerer Einwirkung nicht zu schädigen vermag. Der gleiche Versuch wurde mit dem Antivibrioserum ausgeführt. Das Antivibrioserum (0,5 ccm) neutralisiert das Schlangengift ebenfalls nicht, sowie umgekehrt das Schlangengiftserum 0,5 ccm, welches gegen Schlangengift sich als wirksam erwiesen hatte, die tödliche Dosis des Vibriogiftes nicht zu schädigen im stande ist. Bei der Nachprüfung der Angaben Calmettes gelang es uns weiter weder mit Lyssaserum (rabizides Serum) von Hunden noch mit Tetanusserum, das Schlangengift zu neutralisieren. —

Wenn wir das Wesentliche der Arbeit zusammenfassen, so ergibt sich daraus, daß es ein Bakterientoxin gibt, welches ohne Inkubationsstadium, ähnlich wie Schlangengift, akut wirkt.

Gegen dieses Toxin ist im normalen Serum mancher Tiere bereits Antitoxin enthalten. Dieses Antitoxin neutralisiert nur nach längerer Zeit. Das durch Immunisierung gewonnene Antitoxin dagegen wirkt sofort auf das Gift neutralisierend. Das Immunantitoxin wirkt auch kurativ, indem es bei getrennter, aber gleichzeitiger Injektion das Gift noch zerstört. Die Abschwächung des Immunantitoxins erfolgt wahrscheinlich in der Weise, daß die Avidität des Immunantitoxins abnimmt und sich damit dem Typus des normalen Antitoxins nähert.

Literatur.

- 1) Kraus, Wien. klin. Wochenschr. 1901.
- 2) Kraus und Clairmont, Wien. klin. Wochenschr. 1899, 1901. — Kraus und Ludwig, *ibid.* 1902.
- 3) Metschnikoff, Roux und Salimbeni, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1896.
- 4) Ransom, Dtsche med. Wochenschr. 1895.
- 5) Heymans, Bull. de l'acad. r. de Belg. 1898.
- 6) Dönitz, Arch. de pharmac. et de théér. 1897.
- 7) Kraus und Lipschütz, erscheint in der Zeitschr. f. Hyg.
- 8) Markl, Zeitschr. f. Hyg. 1901.
- 9) Wechsberg, erscheint im Centralbl. f. Bakt. etc.
- 10) Calmette, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1895.

1) Das Schlangengift und Antitoxin wurden von Herrn Prof. Calmette in lebenswürdiger Weise Herrn Prof. Paltauf überlassen.

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Biologie des Milzbrandbacillus und sein Nachweis im Kadaver der grossen Haustiere.

Von **J. Bongert**,

städtischem Tierarzt und Leiter des bakteriologischen Laboratoriums auf dem städtischen Schlachthofe zu Berlin.

Mit 3 Tafeln.

Der Milzbrand gehört zu den besterforschten Infektionskrankheiten. Durch die klassischen, grundlegenden Arbeiten Kochs (1) ist der Entwicklungskreis des Milzbrandbacillus festgestellt worden. Wir wissen, daß der Milzbrandbacillus im Tierkörper und in geeigneten Nährflüssigkeiten zu langen Fäden auswächst und nach beendeter Vegetation bei Luftzutritt und einer Temperatur über 12° C (Weil [2]) Sporen bildet, welche nach dem Zerfall der Milzbrandbacillen allein zurückbleiben, jedoch von neuem zu Stäbchen und langen Fäden auswachsen, wenn sie wiederum auf geeignete Nährböden gebracht werden oder in den Tierkörper gelangen. Das Stäbchen ist die vegetative oder Wuchsform, die Spore die Dauerform des Milzbrandbacillus. Während die Milzbrandsporen außerordentlich resistent gegen äußere Einflüsse sind, zeigen die Milzbrandbacillen sich sehr wenig widerstandsfähig und von geringer Lebensdauer. Durch die Untersuchungen Buchners (3), welche durch Schreiber (4) bestätigt wurden, sind nun die Bedingungen festgestellt worden, unter welchen der Milzbrandbacillus Sporen bildet. Buchner konstatierte, daß dauerndes, gutes Wachstum unter den günstigsten Verhältnissen niemals Sporenbildung hervorruft, plötzliche Hemmung des Wachstums oder Erschöpfung des Nährbodens nach voraufgegangener guter Ernährung dahingegen zu jeder Zeit schnell und vollständig Sporenbildung veranlaßt. Die physiologische Ursache der Sporenbildung ist in dem eintretenden Mangel an Ernährungsmaterial zu suchen. Bedingungen zur Sporenbildung sind reichlicher Zutritt von O, eine Temperatur über 12° C und genügende Feuchtigkeit. Einen beschleunigenden Einfluß auf die Bildung von Sporen haben Aqua dest., 2-proz. NaCl-Lösung und verschiedene andere Salzlösungen, wie Schreiber (l. c.) festgestellt hat.

Mit Rücksicht auf die klarliegenden biologischen und morphologischen Verhältnisse des Milzbrandbacillus sollte man nun annehmen, daß die Diagnose des Milzbrandes in jedem einzelnen Falle leicht sei. Trotz der gut differenzierten morphologischen Eigenschaften des Milzbrandbacillus, die so charakteristisch sind, wie kaum bei einem anderen pathogenen Mikroorganismus, kann die Milzbranddiagnose unter gewissen Verhältnissen erhebliche Schwierigkeiten bereiten.

Auf Grund makroskopischer Sektionsmerkmale allein läßt sich die Milzbranddiagnose mit Sicherheit nicht stellen; die endgültige Feststellung des Milzbrandes ist stets von der bakteriologischen Untersuchung abhängig zu machen (Kitt [5]). Die pathologisch-anatomischen Veränderungen des Milzbrandes sind im großen und ganzen septikämischer Natur, wozu noch in der Regel als charakteristisch angesehene Organveränderungen, die sogenannten Milzbrandlokalisationen, treten. Da aber diese letzteren, so vor allen Dingen der Milztumor, die blutig-sulzigen Ergüsse und Oedeme, wenig ausgeprägt sein und sogar fehlen

können, andererseits aber bei allen suffokatorischen Todesarten, welche mit Milzbrand nicht das Geringste zu tun haben, ein Milztumor mit teerartiger Beschaffenheit des Blutes auftreten kann, so bietet der pathologisch-anatomische Befund für sich allein nicht die absolut sichere Grundlage, welche die Diagnose und die durch dieselbe ermöglichte Bekämpfung einer so wichtigen und weitverbreiteten Infektionskrankheit erheischt. Es dürfte somit als ein allgemein gültiges Gesetz anzusehen sein, daß die Milzbranddiagnose nur durch den bakteriologischen Nachweis des Milzbrandbacillus mit Sicherheit zu erbringen ist. Der Nachweis von Milzbrandsporen kommt hierbei weniger in Betracht, da in nichteröffneten Tierkörper der Milzbrandbacillus wegen Sauerstoffmangels keine Sporen bilden kann, andererseits die Milzbrandsporen von anderen Sporen in Gewebsausstrichen nicht zu unterscheiden sind.

Zum bakteriologischen Nachweis der Milzbrandbacillen stehen uns 3 Methoden zur Verfügung:

1) der direkte Nachweis der Milzbrandbacillen durch Ausstreichpräparate von Blut oder Gewebssaft;

2) der indirekte Nachweis und zwar a) durch Impfung von kleinen Versuchstieren, b) durch Anlegen von Plattenkulturen.

Von diesen 3 Methoden hat das Kulturverfahren in praxi bis jetzt am wenigsten Anwendung gefunden, der mikroskopische Nachweis der Milzbrandbacillen in gefärbten Gewebsausstrichen am meisten. Die fast ausschließliche Anwendung der letzteren Untersuchungsmethode ist wohl dadurch zu erklären, daß dieselbe leicht ausführbar ist und in frischen Fällen der Regel nach zum Ziele führt. Die Diagnose stützt sich hierbei auf den Nachweis von mehr oder weniger zahlreichen gleichgeformten Stäbchen mit den morphologischen Eigenschaften des Milzbrandbacillus.

Als charakteristische Merkmale des Milzbrandbacillus gelten: die bei schwacher Vergrößerung rechtwinklige, bei starker leicht konvex erscheinende quere Abstutzung der Einzelglieder (John e), die Größe der letzteren, welche als $1,5-3,0 \mu$ lang, $1,0-1,5 \mu$ dick angegeben werden, die geradlinige oder auch bikonvex erscheinende Form des ungefärbten Zwischenraumes zwischen je 2 Einzelgliedern und das Vorhandensein einer Kapsel bzw. Plasmahülle, welche die Einzelglieder zu Scheinfäden verbindet und zusammenhält. Auf den Nachweis der Kapsel wird besonderes Gewicht gelegt. So leicht nun alsbald nach dem Tode der mikroskopische Nachweis der Milzbrandbacillen in den nach den Färbemethoden von John e (6), Klett (7) oder Olt (8) hergestellten Deckglaspräparaten ist, so schwierig und um so unsicherer gestaltet sich derselbe, je größer der Zeitraum ist, welcher zwischen Tod des Tieres und Untersuchung liegt. Obwohl man sich dieser Schwierigkeit des mikroskopischen Nachweises der Milzbrandbacillen in faulendem Material bewußt ist, verharrte man im allgemeinen dennoch bei der Ansicht, daß die Untersuchung von gefärbten Gewebsausstrichen für sich allein bei sachgemäßer Würdigung der oben erwähnten morphologischen Eigenschaften des Milzbrandbacillus die genügende Sicherheit gewähre, um denselben in einem Gemisch von gleich oder ähnlich geformten Fäulnisstäbchen herauszuerkennen. Diesen Standpunkt hat man bis jetzt bei den veterinärpolizeilichen Feststellungen des Milzbrandes als maßgebend angesehen. In den Fällen, in denen infolge vorgeschrittener Fäulnis des Kadavers das Auffinden von Milzbrandbacillen Schwierigkeiten bereitet, wird die mikroskopische Untersuchung des Blutes aus

einer peripheren Vene, welches weniger leicht der Fäulnis anheimfällt, empfohlen (Steinbach [13a]), oder auch die Impfung kleiner Versuchstiere. Man geht dabei von der Voraussetzung aus, daß bei der großen Empfänglichkeit der letzteren für die Milzbrandinfektion die Impfung eine weit sicherer Gewähr bietet für eine richtige Diagnose, wie das gefärbte Ausstrichpräparat. Allein diese Annahme trifft in vielen Fällen nicht zu. Selbst bei kutaner Impfung, welche zur Vermeidung von Septikämie infolge der Fäulniserreger empfohlen wurde (Koch, Kitt [9]), kann das Tierexperiment bei faulem Milzbrandmaterial ein vollkommen negatives Ergebnis liefern, wie des näheren unten ausgeführt wird. Der kulturelle Nachweis der Milzbrandbacillen durch das Plattenverfahren hat bisher fast nur in den Laboratorien Anwendung gefunden, da dasselbe für die Praxis als zu umständlich angesehen wurde. Gegen diese bisher einseitig ausgeführte bakteriologische Milzbranduntersuchung sind namentlich in letzter Zeit von verschiedener Seite Bedenken erhoben worden. Dieselben beziehen sich besonders auf die differentialdiagnostische Bedeutung der Milzbrandbacillenkapsel.

Zunächst machte Noetzel (10) darauf aufmerksam, daß die Behauptung Johnes, die sichere Darstellung einer wohlentwickelten Kapsel unterscheide den Milzbrandbacillus ohne weiteres von allen Bakterienarten, welche bei der Untersuchung von Tierleichen möglicherweise Anlaß zu Verwechslung mit dem Milzbrandbacillus geben könnten, einer Einschränkung bedürfe, da man auch bei Fäulnisstäbchen, welche sich in Kadavern 10–15 Stunden nach dem Tode vorfinden, mit der Johneschen Färbemethode Kapseln deutlich zur Erscheinung bringen könne. Man sei daher bei der Unterscheidung der Milzbrandbacillen von ähnlichen Fäulnisstäbchen nach wie vor auf die übrigen morphologischen Eigenschaften des Milzbrandbacillus angewiesen.

Sodann konstatierte Tschernogoreff (11), daß beim Milzbrande des Pferdes und Schweines an den Milzbrandstäbchen Kapseln schwer darzustellen seien. Dieselbe Beobachtung machte Schmidt (12) beim Pferd milzbrand.

Dazu kommt noch, daß in faulem Kadaver die färberische Darstellung der Kapsel sehr oft nicht gelingt, wie auch Johnes und Klett l. c. angeben. Lüpke (13) warnt davor, „sich bei der Milzbranddiagnose auf das Resultat der mikroskopischen Untersuchung zu versteifen, weil es eine spezifische und absolut sichere Färbemethode für den Milzbrandbacillus nicht gibt. Da auch eine Reihe anderer Bakterien gleich dem Milzbrandbacillus eine Plasmahülle zeigen, lasse bei älteren Kadavern die Kapselfärbung häufig im Stiche“. Die Kapseldarstellung ist nach L. nicht selten der Anlaß zu einer irrthümlichen Diagnose. Auch Arndt (14) ist der Meinung, daß trotz der empfohlenen Färbemethoden der Milzbrandbacillen Verwechslungen mit Kadaverbacillen möglich seien. Dahingegen gelang es Steinbach (l. c.) angeblich in 115 untersuchten Milzbrandfällen in Ausstrichen von Halsvenenblut stets und in größerer Menge Milzbrandbacillen nach der Olt'schen Färbemethode nachzuweisen. Obduktion und Probeentnahme erfolgten meist am Tage nach dem Tode. Jedoch selbst wenn mehrere Tage zwischen Tod und Entnahme der Blutproben verfließen waren, konnte St. stets Milzbrandbacillen nachweisen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß St. seine mikroskopischen Befunde nicht durch Plattenkultur und Impfung kontrolliert hat. Johnes und Klett (l. c.) konnten gut differenzierte Milzbrand-

bacillen mit deutlicher Kapsel in der Regel noch am 4. Tage nach dem Tode nachweisen. In einem 6 Tage nach dem Tode des Tieres angefertigten Blutaussstriche konnte John e die Kapseln nicht mehr nachweisen; die Milzbrandbacillen waren schon in Zerfall geraten. In solchem Falle würde, wie John e bemerkt, die Diagnose des Milzbrandes (sc. durch Gewebsausstriche) erheblichen Schwierigkeiten begegnen. Klett vermochte in den Präparaten aus dem Blute oder Milzsaft einer 6 Tage vorher an Milzbrand verendeten Kuh zwischen den zahllosen Fäulnisstäbchen noch Milzbrandbacillen mit scharfer Differenzierung zu erkennen. Die von John e und Klett angestellten Untersuchungen, wie lange nach dem Tode die Milzbrandbacillen im Kadaver mit Hilfe der von ihnen angegebenen Färbemethoden nachzuweisen sind, erstrecken sich, soweit aus ihren Angaben ersichtlich ist, auf exenterierte Organe von Milzbrandkadavern. Die milzbrandigen Untersuchungsobjekte waren somit offener Fäulnis ausgesetzt, welche bedeutend langsamer und auch in anderer Weise verläuft, wie die Fäulnis im nicht eröffneten Kadaver durch anaerobe Bakterien. Die Resultate der John eschen und Klettschen Versuche lassen sich somit ohne Einschränkung nicht auf die Verhältnisse in der Praxis übertragen. Es geht dieses schon aus einem Versuch hervor, den Klett an einem an Impfmilzbrand gestorbenen Kaninchen angestellt hat, welches er bei 30—36° C uneröffnet liegen ließ. 24 Stunden nach dem Tode fanden sich an den Bacillen deutliche Kapseln vor, nach dieser Zeit waren sie nicht mehr nachzuweisen. Klett läßt es dahingestellt sein, „ob dann die Milzbrandbacillen ganz verschwunden sind oder ob nur die Hülle verloren gegangen und die kernartige Protoplasmamasse zurückgeblieben ist“. Diese Frage wäre aber leicht durch das Plattenkulturverfahren zu entscheiden gewesen.

Berndt (15) konnte in einer alsbald nach dem Tode einer an Milzbrand gestorbenen Kuh entnommenen Blutprobe, welche in einer verkorkten Flasche bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde, noch am 13. Tage nach dem Tode die Kapseln der Milzbrandbacillen nachweisen und an den streifigen Körnchenhaufen die Anwesenheit der Milzbrandbacillen diagnostizieren.

Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte Mehrdorf (16) auf Grund seiner Untersuchungen, wonach die Milzbrandbacillen länger der Fäulnis widerstehen sollen, als bisher angenommen wurde. Mit Hilfe der Klettschen Doppelfärbung will M. in vollständig durchfaulten Massen noch nach 12 Tagen neben den zahlreichen Bakterien anderer Art die Milzbrandbacillen auf das bestimmteste nachgewiesen haben. Später (16b) schränkt Mehrdorf seine Ansicht über die Zuverlässigkeit des Nachweises der Milzbrandbacillen durch die mikroskopische Untersuchung gefärbter Deckglasaussstriche bedeutend ein und hält in zweifelhaften Fällen die Impfung für erforderlich. Olt (l. c.) gibt an, daß schon nach wenigen Tagen, oft schon nach 2mal 24 Stunden der mikroskopische Nachweis der Milzbrandbacillen unmöglich sein kann.

Sämtlichen oben genannten Untersuchungen über die Tenacität der Milzbrandbacillen im Kadaver bzw. über die Dauer der Möglichkeit ihres Nachweises durch die mikroskopische Untersuchung ist jedoch eine strikte Beweiskraft nicht beizumessen, da keiner der Autoren es unternommen hat, seine auf Grund der subjektiven Wahrnehmung gestellte Diagnose durch Probeimpfung oder noch besser durch das Plattenverfahren zu kontrollieren. Bei dieser Sachlage und mit Rück-

sicht auf die in weiten Grenzen schwankenden Angaben über die Dauer der Möglichkeit des mikroskopischen Nachweises der Milzbrandbacillen im Kadaver schienen mir wegen der Wichtigkeit, welche die Milzbranddiagnose in veterinärpolizeilicher Hinsicht erheischt, eingehende Untersuchungen erforderlich. Es war:

1) nachzuprüfen, wie lange nach dem Tode bei verschiedener Aufbewahrung des Milzbrandmaterials der Milzbrandbacillus in den nach den gebräuchlichen Färbemethoden von Johne, Klett (einfache und Doppelfärbung) und Olt hergestellten Ausstrichpräparaten mit Sicherheit zu erkennen ist, und wie lange dieser Nachweis bei uneröffnetem Kadaver gelingt;

2) zu untersuchen, welche von den 3 Untersuchungsmethoden: Ausstrichpräparat, Impfung oder Plattenkultur, zum Nachweise des Milzbrandbacillus als die sicherste anzusehen ist;

3) ein Verfahren anzugeben, wie Milzbrandmaterial am zweckmäßigsten behufs späteren Nachweises aufbewahrt und versandt wird.

Untersuchungen in der sub 2 angegebenen Richtung liegen, soweit ich aus der Literatur entnehmen konnte, nur zwei¹⁾ vor. Lange (17) erhielt 5 Tage nach dem Tode eines Gerbers zwei in Fäulnis übergegangene Hautstücke zur Untersuchung auf Milzbrand. In Ausstrichpräparaten waren Milzbrandbacillen nicht nachzuweisen. In 12 angelegten Platten konnte keine einzige Milzbrandkolonie oder auch nur milzbrandähnliche Kolonien gefunden werden, während von 4 geimpften Mäusen 2 an Milzbrand starben. Auf Grund dieses Ergebnisses hält L. die Impfung von Mäusen für „das feinere und schärfere Reagens auf Milzbrand“ als die Kultur. Im Gegensatz zu der Beobachtung von L. konnte C. Fraenkel (18) feststellen, daß gerade beim Milzbrand umgekehrt die Kultur keineswegs selten noch ein brauchbares Resultat liefert, wo das Tierexperiment im Stiche läßt. Von Proben 5 verschiedener Milzbrandfälle — 3 vom Menschen, je 1 vom Rinde und vom Pferde stammend — ergab die mikroskopische Prüfung der ungefärbten und gefärbten Präparate „in keinem einzigen Falle ein einigermaßen sicheres Resultat“. In 3 Fällen ergab die Plattenkultur ein positives Ergebnis, während die Impftiere gesund blieben, in 1 Falle wurde der Nachweis der Milzbrandbacillen durch Plattenkultur und Impfung gesichert, und in 1 Falle wurde nur durch die Impfung die Diagnose erbracht.

Die Untersuchungen habe ich Mitte Mai 1901 im hygienischen Institut der königlichen tierärztlichen Hochschule zu Berlin begonnen und im Dezember 1902 in dem mir zur Zeit unterstellten Laboratorium auf dem Berliner Schlachthofe zu Ende geführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle meinem ehemaligen Lehrer und Chef, Herrn Prof. Dr. Ostertag, für die Ueberlassung des Untersuchungsmaterials und für die mannigfachen Anregungen und das Interesse, welches er dem Fortgang meiner Arbeit stets entgegenbrachte, meinen aufrichtigsten Dank abzustatten.

Versuchsordnung.

Zu meinen Untersuchungen standen mir zur Verfügung die Milzen und in einzelnen Fällen auch die Blutproben von 14 an Milzbrand ge-

1) Während der Drucklegung erschien in der Zeitschr. f. Veterinärhygiene. Jahrg. I. Heft 1 u. 2 eine Arbeit von Fischeoeder, welche ebenfalls diesen Gegenstand behandelt.

storbenen großen Haustieren und zwar von 10 Rindern, 2 Schafen und 1 Ziege. Die Prüfung der Tenazität der Milzbrandbacillen im Kadaver wurde zu gleicher Zeit durch Ausstrichpräparate, Plattenkultur und Verimpfung an Mäuse ausgeführt. Um jedoch gleichzeitig einen Aufschluß über die Zweckmäßigkeit der bisher gebräuchlichen Aufbewahrungsmethoden von Milzbrandmaterial behufs späteren Nachweises zu gewinnen, wurde jedesmal ein Stück Milz offen stehend, ein zweites in einer feuchten Kammer und eine genügende Menge abgestreifter Milzpulpa in einer zugedöckten Flasche bei Zimmertemperatur an einem dunkeln Orte aufbewahrt. Außerdem wurde an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen bei steriler Entnahme aus der Tiefe Milzpulpa auf die Mitte der sterilen Durchbruchfläche einer gekochten Kartoffel gebracht (Verfahren nach Olt) und Kartoffelröhrchen besät. Jede dieser 4 bzw. 5 Milzbrandproben wurde täglich nach den angegebenen 3 Methoden auf das Vorhandensein von Milzbrandbacillen untersucht, und jede einzelne Untersuchungsmethode so lange fortgesetzt, als Milzbrandbacillen durch dieselbe nachzuweisen waren. Von der Impfung wurde nur in den ersten Fällen und später noch einmal vergleichsweise Gebrauch gemacht, in den weiteren Fällen jedoch davon Abstand genommen, da sie sich sehr bald im Vergleich zu den beiden anderen Untersuchungsmethoden als wenig zuverlässig für die Milzbranddiagnose erwies. Die verschiedentlich vorgenommene Prüfung auf Sporenbildung der Milzbrandbacillen geschah in der Weise, daß reichlich Material in verflüssigten und alsdann auf etwa 60° abgekühlten Agar übertragen, 1 Stunde lang auf 70° erhitzt und zur Platte ausgegossen wurde. Da die Temperatur- und Witterungsverhältnisse einen bedeutenden Einfluß auf die Fäulnisvorgänge im Kadaver und somit auch auf die längere oder kürzere Lebensdauer der Milzbrandbacillen ausüben, so sind zum besseren Verständnis des Ausfalles der einzelnen Versuche in den Versuchstabellen kurze Auszüge aus den offiziellen Wetterberichten angegeben. Aus demselben Grunde sind auch die Zeiten, wann die Sektion vorgenommen wurde und das Milzbrandmaterial zur Untersuchung gelangte, festgestellt worden.

1. Der mikroskopische Nachweis der Milzbrandbacillen in Ausstrichpräparaten.

Die von dem offen aufbewahrten Ausgangsmaterial, dem Milzstück in der feuchten Kammer, von der in einer Flasche aufbewahrten Milzpulpa und von der beschickten Kartoffel täglich angefertigten Ausstriche blieben einige Stunden offen an der Luft liegen, um lufttrocken zu werden, und wurden dann nach den von John e, Klett und Olt angegebenen Verfahren gefärbt. Diese gebräuchlichen Färbemethoden bezwecken hauptsächlich eine deutliche Darstellung der für den Milzbrandbacillus charakteristisch angesehenen Kapsel oder Gallerthülle. Grundbedingung hierzu und zur Auflösung der Zellverbände der Milzbrandfäden in die Einzelglieder ist, worauf John e besonders aufmerksam macht, das vorsichtige Erwärmen der schwappend mit Farbstoff bedeckten Deckglaspräparate über der Flamme so lange, bis Dämpfe aufsteigen. Bei der Olt'schen Safraninfärbung ist ein 2—3maliges Aufkochen der Farblösung mit nachfolgender etwa 2 Minuten langer Einwirkung derselben erforderlich, um eine einigermaßen deutliche Färbung in dem matten Rotbraun des Safranins zu erzielen. Die Wirkung des notwendigen Erwärmens der Farblösung auf die Darstellung der Gallertkapsel besteht nach John e

in einer Quellung derselben infolge reichlicher Aufnahme von Wasser unter dem Einflusse der Wärme. Ist diese Ansicht richtig, dann muß auch die Einwirkung von erwärmtem Wasser auf das lufttrockene und fixierte Präparat vor der Färbung denselben Effekt haben. Das ist jedoch nicht der Fall. Erwärmt man ein fixiertes und mit Wasser schwappend bedecktes Milzbrand-Ausstrichpräparat bis zum Aufsteigen von Dämpfen vorsichtig über der Flamme, färbt alsdann wie gewöhnlich ohne Erhitzen und behandelt es nach dem Ausspülen kurz mit 2-proz. Essigsäure, so wird man sich überzeugen können, daß im Gegenteile keine Quellung der Milzbrandbacillen bzw. ihrer Kapseln eingetreten ist, sondern vielmehr ein Schrumpfen, ein Zerfall des Zelleibes durch Auflösung seines Inhaltes. Man sieht leere Kapseln in größerer Zahl, in welchen hier und da einzelne Körner enthalten sind, aber keine Kapselstäbchen. Das Prinzip der Kapseldarstellung der Milzbrandbacillen dürfte somit in einem intensiven Färben mit nachfolgendem schwachem oder kurz anhaltendem und aus diesem Grunde nur peripher sich geltend machendem Entfärben bestehen. Die intensive Färbung erreicht *Serafini* (19), dem die Priorität gebührt, zuerst auf das Vorhandensein einer färberisch darstellbaren Kapsel bei den frisch dem Kadaver entnommenen Milzbrandbacillen aufmerksam gemacht zu haben, durch Anilinwasser-Gentianaviolett, *John e*, *Klett* und *Olt* durch vorsichtiges Erwärmen oder Aufkochen der Farblösung. Die Entfärbung geschieht bei dem von *Serafini* angegebenen Verfahren durch Alkohol, bei dem von *John e* mit 2-proz. Essigsäure und bei *Klett* durch erwärmtes Wasser, welches durch 8—12maliges Hindurchziehen des abgespülten und mit Wasser voll bedeckten Deckglaspräparates durch die Flamme hergestellt wird und so allmählich entfärbend auf das gefärbte Präparat einwirken kann. Bei der *Olt*schen Safraninfärbung ist eine Entfärbung zur Darstellung der Kapsel nicht erforderlich; dieselbe markiert sich ohne Entfärbung. Dasselbe kann man sehr oft bei der gewöhnlichen Färbung mit anderen Farbstoffen beobachten, namentlich bei der Verwendung einer ausgereiften, alten *Löffler*schen Methylenblaulösung (*Heim* [21]). Von der *Gram*schen Färbemethode habe ich nur ausnahmsweise Gebrauch gemacht, da bei dieser die morphologischen Eigentümlichkeiten des Milzbrandbacillus nicht deutlich hervortreten, und außerdem verschiedene, dem Milzbrandbacillus ähnliche Fäulnisstäbchen ebenfalls die *Gram*sche Färbung annehmen. Bemerken möchte ich nur, daß mir in einzelnen Fällen auch mit der *Gram*schen Färbemethode bei kurzer Entfärbung mit Alkohol die Differenzierung eines intensiv gefärbten zentralen Teiles, des „Kernstäbchens“, von einer schwach oder ungefärbten Peripherie, Plasmahülle, welche sich nach außen durch einen deutlich gefärbten Saum abgrenzte, gelang. Die Möglichkeit der Darstellung einer Kapsel oder Plasmahülle mit der *Gram*schen Färbemethode kann jedoch nicht weiter überraschen, da diese im Prinzip der *Serafini*schen Methode der Kapseldarstellung entspricht.

Auf die Einzelheiten der gebräuchlichen Färbemethoden von *John e*, *Klett* und *Olt* einzugehen, erübrigt sich, da diese als bekannt vorausgesetzt werden können. Einen besonderen Vorzug von einer der drei genannten Färbemethoden, namentlich in Bezug der Kapseldarstellung, habe ich nicht feststellen können.

Wie bereits in der Einleitung angedeutet wurde, bestand bisher die Ansicht, daß der Milzbrandbacillus im Gegensatz zu der großen Mehrheit der übrigen Bakterien lediglich nach seinen morphologischen Eigen-

schaften durch die mikroskopische Untersuchung von Gewebsausstrichen, die nach einer der bekannten Färbemethoden behandelt worden sind, mit Sicherheit als solcher erkannt werden kann. Man läßt also bei der Milzbranddiagnose allgemein noch die Gestalt des Erregers als sicheres diagnostisches Merkmal gelten, ein Standpunkt, welcher bei allen anderen durch Bakterien bedingten Infektionskrankheiten schon lange als unzulässig erkannt worden ist. Ich erinnere in dieser Beziehung an die Diphtherie und vor allen Dingen an die Tuberkulose. Es müssen außer den morphologischen Eigenschaften noch biologische Merkmale zur Diagnose herangezogen werden. Diese Ausnahmestellung des Milzbrandes in der bakteriologischen Diagnostik kann ich in Uebereinstimmung mit den bisherigen Beobachtungen auf Grund meiner Versuche als allgemein richtig nicht ansehen, weil die morphologischen Eigentümlichkeiten des Milzbrandbacillus im faulenden Kadaver nicht immer konstant und derart ausgeprägt sind, daß er von anderen ähnlichen Stäbchen ohne weiteres unterschieden werden kann.

Die Veränderungen, welche der Milzbrandbacillus im faulenden Kadaver erleidet, können mannigfacher Natur sein.

Was zunächst die Darstellung der Kapsel oder Plasmahülle anbelangt, so ist unbedingt zuzugeben, daß dieselbe ein wertvolles morphologisches Merkmal auch für die Erkennung der Milzbrandbacillen im faulenden Kadaver darstellt, allein sie gelingt nicht stets und ist auch nicht ausschließlich dem Milzbrandbacillus eigentümlich, wie ich in Uebereinstimmung mit Noetzel (l. c.) u. a. mehrere Male feststellen konnte. Daß beim Milzbrand des Pferdes und Schweines die Darstellung von Kapseln an den Milzbrandbacillen auch im frischen Kadaver große Schwierigkeiten bereitet und in der Regel nicht gelingt, wurde bereits hervorgehoben. Ich habe aber auch mehrere Male beim Rindermilzbrand konstatieren können, daß die Kapselfärbung der Milzbrandbacillen schon viel früher im Stiche ließ, wie John e und Klett (l. c.) angegeben haben. In Milzbrandmaterial einer Kuh, welches in den ersten 36 Stunden nach dem Tode noch gute Kapselpräparate lieferte, waren nach dieser Zeit mit dem Auftreten von Fäulnisbakterien mit differenzierter Kapsel versehene Milzbrandstäbchen trotz aller möglichen Mühe nicht mehr nachzuweisen. In einem anderen Falle gelang der Nachweis von Kapselstäbchen in Milzausstrichen von vorneherein nicht, nur einzelne Milzbrandstäbchen zeigten eine undeutliche Plasmahülle, während an der Mehrzahl derselben eine solche nicht zu erkennen war (No. 5 d. Tab.). In den Blutausstrichen von demselben Tier waren jedoch Milzbrandbacillen mit deutlicher Kapsel in mäßiger Zahl nachzuweisen. Ohne Zweifel ist die Kapsel oder Plasmahülle ein integrierender Bestandteil des Milzbrandbacillus, wie Kern (21) nachgewiesen hat, allein der Nachweis derselben gelingt nicht immer gleich gut, da sie nicht immer gleichmäßig entwickelt ist. Die mehr oder weniger deutliche Entwicklung der Kapsel scheint von der Zusammensetzung des Mediums abhängig zu sein, auf welchem der Milzbrandbacillus gewachsen ist, oder in dem er sich befindet. Als Beweis hierfür ist die Tatsache anzusehen, daß in Serumkulturen die Milzbrandbacillen schöne Kapseln zeigen, in Agar- und Bouillonkulturen jedoch in der Regel nicht oder nur ganz vereinzelt, wie Haase (22) und John e (ebenda) nachgewiesen haben, und was ich bestätigen kann. Aber auch selbst die Milzbrandbacillen derselben Blutserumkultur verhalten sich in Betreff des Vorhandenseins einer deutlichen Kapsel nicht immer gleich. Besonders auffällig konnte ich eine un-

gleichmäßige Entwicklung der Kapsel an Milzbrandbacillen aus flüssigen Blutserumkulturen beobachten. Während die Mehrzahl der Milzbrandbacillenfäden eine schöne, breite Plasmahülle zeigten, erschienen einzelne Fäden oder Glieder derselben kapsellos, ihr Bacillenleib verschmälert und auch länger, wie bei den mit Kapseln versehenen Fäden. Mit dem Aelterwerden der Kultur nahm die Zahl der kapsellosen Milzbrandfäden zu. Vielleicht ist die durch das Wachstum der Milzbrandbacillen bedingte Veränderung in der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens, speziell die eintretende saure Reaktion desselben, die Ursache des Verlustes der Bacillenkapsel. Eine ähnliche Veränderung in der chemischen Zusammensetzung der Gewebsflüssigkeit infolge der Fäulnisvorgänge muß auch als die Ursache angesehen werden, daß der färberische Nachweis der Milzbrandbacillenkapsel im faulenden Tierkörper mit Zunahme der Fäulniserreger immer schwieriger und zuletzt unmöglich wird. Denn nur diese Annahme erklärt die Beobachtung, daß in Ausstrichen von Blut aus peripheren Venen (Ohrvene) Kapselstäbchen länger nachzuweisen sind, wie in Milzausstrichen, da ersteres weniger leicht der Fäulnis anheimfällt, wie die Milz und die übrigen Hinterleibsorgane.

Zu dem zeitweiligen Versagen der färberischen Darstellung der Milzbrandbacillenkapsel tritt nun noch die Möglichkeit hinzu, daß in den Milzbrandkadavern kurze Zeit nach dem Tode vom Darme aus Fäulnisbacillen in die Blutbahn eindringen, an welchen sich ebenfalls Kapseln zur Darstellung bringen lassen und die auch im übrigen die größte morphologische Uebereinstimmung mit Milzbrandbacillen zeigen können. Ein solcher Nachweis gelang mir nicht nur in Milzbrandkadavern, welche in Ausstrichpräparaten Milzbrandbacillen nicht mehr erkennen ließen (Phot. 1), sondern auch in anderen Kadavern, die bis zur Vornahme der Sektion einige Zeit gelegen hatten (Phot. 2). Allerdings sind diese Kapseln der Fäulnisstäbchen nicht so deutlich und schön ausgeprägt, wie man sie in der Regel beim Milzbrandbacillus zu sehen Gelegenheit hat. Allein auch bei letzterem sind die Hüllen nicht immer gleich gut entwickelt, wie wir oben gesehen haben.

Es ist somit das Vorhandensein einer Kapsel oder Plasmahülle als ein absolut konstantes und ausschließlich dem Milzbrandbacillus eigentümliches Merkmal nicht länger anzusehen.

Außer dem Verschwinden der Kapsel treten nach dem Tode des Tieres an den Milzbrandbacillen noch andere Veränderungen in morphologischer Beziehung auf. Zunächst sieht man von Tag zu Tag die Zahl der Milzbrandstäbchen abnehmen. Die langen Fäden, zu welchen die Milzbrandbacillen nach dem Tode bei günstiger Temperatur auswachsen können, verschwinden allmählich. Die Vermehrung sistiert. Infolgedessen erscheinen die Milzbrandbacillen vielfach länger wie im Anfange, da die Teilung in 2 Einzelzellen ausbleibt. Die Abnahme der Zahl der Milzbrandbacillen verläuft parallel mit dem Zerfall der Zellkerne. In dem Maße, wie die chromatische Substanz der Zellkerne in eine diffus sich färbende Detritusmasse zerfällt, nimmt auch die Färbbarkeit der Milzbrandbacillen ab, während die lebenskräftigen Fäulnisbakterien, welche sich angesiedelt haben, eine satte Färbung annehmen. Diese schwache Färbbarkeit der Milzbrandbacillen im faulenden Kadaver ist, worin ich John e (l. c.) zustimme, ein gutes Erkennungsmerkmal gegenüber der wegen ihrer Größe etwa mit diesen zu verwechselnden Fäulnisbacillen. Mikroskopisch läßt sich dieser Zerfall der chromatischen Substanz daran erkennen, daß die Deckglaspräparate von Tag zu Tag zunehmend schwächer

gefärbt erscheinen. Das gleichzeitige Auftreten der kräftig sich färbenden Fäulnisbakterien hebt diese Erscheinung nicht vollkommen auf. Die geringe Tinktionsfähigkeit der in Zerfall begriffenen Milzbrandstäbchen tritt immer mehr hervor, ja man kann beobachten, daß sie bei dem zur Darstellung der Kapsel notwendigen Entfärben mit 2-proz. Essigsäure oder nach der Methode von Klett mit erwärmtem Wasser oft fast vollkommen entfärbt erscheinen. In solchem Falle ist eine einfache Färbung mit Löfflers Methylenblaulösung, wie Heim (l. c.) es angegeben hat, zweckmäßiger, da man hierdurch eine einigermaßen deutliche Färbung des Bacillenleibes erreichen und unter Umständen auch die Kapseln zur Anschauung bringen kann, welche hierbei eine rosarote Färbung annehmen (Methylenblau medicin.). Schließlich sind die Milzbrandbacillen vollkommen zerfallen und ausgelaugt und nehmen überhaupt keine Färbung mehr an.

Außer dieser mehr gleichmäßigen Auflösung der Milzbrandbacillen ist noch ein von der Peripherie des Bacillenleibes ausgehender Zerfall zu beobachten. Im Anfange sehen die Stäbchen wie zerfressen aus, sie färben sich unterbrochen. Dann nehmen sie allmählich an Dicke ab, so daß schließlich nur noch ein schmaler, unregelmäßiger Strich in der meist deutlich hervortretenden Kapsel als Ueberrest des Bacillenkörpers zurückbleibt. Aber nicht nur am Rande, sondern auch inmitten des Bacillenkörpers treten ungefärbte Lücken auf. Derselbe zerfällt in verschieden große Körner, die aufgelöst oder aus der Kapsel ausgestoßen werden, so daß schließlich nur noch die leere Hülle übrig bleibt, in welcher noch hie und da vereinzelte kleine Granula zu sehen sind. Diese sogenannten leeren Milzbrandkapseln, welche auch im frischen Milzbrandmaterial vereinzelt auftreten können, nehmen mit dem zunehmenden Zerfall der Milzbrandbacillen an Zahl zu, bis schließlich nur noch Kapselüberreste in Gestalt von feinen Strichen als letzte Andeutungen der Milzbrandbacillen vorhanden sind (Phot. 3).

Diese Art der Auflösung der Milzbrandbacillen ist auf osmotische Störungen zurückzuführen und als Plasmolyse zu deuten, als eine Ablösung des Protoplasmas von der Zellwand unter gleichzeitiger Kontraktion und Verdichtung desselben zu verschieden großen, stärker lichtbrechenden und sich intensiver färbenden Körnern (A. Fischer [23a]) Den weiteren Zerfall und die Auflösung dieser Körner muß man sich durch Plasmoptyse zu stande gekommen denken, indem infolge gesteigerten Innendruckes in der gequollenen Bakterienzelle jene körnigen Zerfallsmassen ausgestoßen und durch Quellung allmählich zerstört und aufgelöst werden (A. Fischer [23b]).

Auf die sogenannten leeren Milzbrandkapseln hat zuerst R. Koch (1b) aufmerksam gemacht und dieselben abgebildet. In den Milzausstrichen einer an Impfmilzbrand gestorbenen weißen Ratte befanden sich „neben dunkelgefärbten lebensfähigen in demselben Bacillus abgestorbene Glieder, die sich dadurch auszeichneten, daß sie die Anilinfarben nicht mehr annahmen, etwas gequollen aussahen und fast den Eindruck machten, als wäre es eine ihres Inhalts beraubte Hülle.“

Auch Berndt (15) hat die oben geschilderte Auflösung der Milzbrandbacillen bereits beschrieben. Er konnte noch am 13. Tage nach dem Tode eine deutliche Milzbrandbacillenkapsel mit der Klettschen Doppelfärbung nachweisen und glaubt an dem streifigen Körnchenhaufen, welche noch die Gestalt der ursprünglichen Hüllen der Milzbrandbacillen aufweisen, Milzbrand mit einiger Sicherheit diagnostizieren zu können.

Dieser Ansicht, welche sich auf die Beobachtung eines einzigen Versuches stützt, kann ich mich nicht anschließen, da dieser Auflösungsprozeß nicht nur den Milzbrandbacillen, sondern auch vielen anderen Bacillenarten, wie A. Fischer (l. c.) festgestellt hat, eigentümlich ist. Es können demnach solche Reste von Bakterienhüllen oder Körnchenhaufen, die noch die Form von Bacillen aufweisen, ohne weiteres auf das Vorhandensein von Milzbrandbacillen nicht bezogen werden. Allerdings ist zuzugeben, daß die leeren Plasmahüllen oder Kapseln von der Form der Milzbrandbacillen in größerer Zahl in manchen Fällen einen gewissen Anhaltspunkt für die Annahme gewähren, daß Milzbrand vorgelegen hat. Jedoch absolut beweisend für die Richtigkeit der Milzbranddiagnose kann auch das Vorhandensein von leeren Kapseln aus den oben angegebenen Gründen nicht angesehen werden. (Fortsetzung folgt.)

Nachdruck verboten.

Zur Abhandlung von Krompecher und Zimmermann „Ueber die Virulenz der Tuberkelbacillen“ in Bd. XXXIII No. 8 dieser Zeitschrift.

Von Dr. Vagedes, Berlin.

Krompecher und Zimmermann haben in der oben genannten Abhandlung das Ergebnis ihrer Untersuchungen mitgeteilt und sind dabei zu dem Schlusse gekommen, daß die aus Fällen chirurgischer Tuberkulose gezüchteten Tuberkelbacillenstämme im allgemeinen gleiche Virulenz haben. Verff. erheben nun gegen meine in Bd. XXVIII d. Ztschr. f. Hyg. veröffentlichten Versuche, auf Grund deren ich zu dem Schlusse gelangte, daß die verschiedenen aus menschlichem (Lungen-) Material gezüchteten Tuberkelbacillenstämme sehr verschiedene Virulenz gegenüber Kaninchen zeigen, Einwände, unter denen, wie sie sagen, das „Werk meiner Klassifikation von selbst zusammenbricht“. Allerdings überheben mich Verff. durch Mitteilung der Tabellen V und VI auf p. 599 der Mühe, diese Einwände im einzelnen zu widerlegen, und sie sagen selbst, daß diese Tabellen bloß durch Annahme einer verschiedenen Virulenz zu erklären sind. Weiter habe ich in der Tat durch meine Arbeit nichts nachweisen wollen, und mag man, der Uebersicht wegen, eine Klassifikation aufstellen, wie ich es getan habe, oder nicht, genug, daß es sehr virulente und wenig virulente Tuberkelbacillenstämme gibt, eine Tatsache, die für die menschliche Pathologie ohne Zweifel von großer Bedeutung ist.

3 von meinen virulentesten Stämmen sind allerdings durch Kaninchenpassagen gewonnen, aber unter diesen befinden sich 2 Perlsuchtstämme, die, wie mich weitere Untersuchungen überzeugt haben, für Kaninchen überhaupt sehr virulent sind, 2 andere meiner hochvirulenten Stämme (M XIII und Fu XXIII) sind aber direkt aus vom Menschen stammendem Material gezüchtet, und andererseits habe ich mich durch hinreichend zahlreiche Versuche überzeugt, daß eine ausgesprochene Virulenzsteigerung selbst durch 12-malige Kaninchenpassage nicht zu erreichen ist (p. 299—301 meiner Arbeit). Ein Unterschied in der Virulenz ist ganz konstant, und diesem haben die Autoren scheinbar gar keine Aufmerksamkeit geschenkt: Die hochvirulenten Kulturen erzeugen bei Impfung in

die vordere Augenkammer disseminierte Tuberkulose, wozu die weniger virulenten nicht im stande sind. Man kann also Tierpassagen von der vorderen Augenkammer aus nur mit virulenten Kulturen anstellen (p. 285 meiner Arbeit).

Daß ich der Zeit, innerhalb deren ein Versuch beendet war, hinreichend Rechnung getragen habe, darauf wies ich bereits in den Bemerkungen zu der den gleichen Gegenstand behandelnden Arbeit von Veszpremi hin (No. 9 dieser Zeitschr.).

Auch der individuellen Disposition, auf welche Krompacher und Zimmermann bei den Versuchen Wert legen, habe ich wohl genügend Beachtung geschenkt und (p. 288) ausdrücklich hervorgehoben, daß die Toleranz der Kaninchen gegen die Tuberkulose der inneren Organe eine verschiedene ist, so daß ein Tier schon Veränderungen erliegt, bei denen ein anderes noch leidlich gesund erscheint. Aus diesem Grunde empfahl ich auch, die Tiere nach bestimmten Zeitabschnitten zu töten und die Veränderungen der inneren Organe festzustellen.

Krompacher und Zimmermann halten es weiter nicht für ausgeschlossen, daß Mischinfektionen zu Lebzeiten des betreffenden Menschen, von denen die Kulturen stammen, auf die Virulenz einen Einfluß gehabt haben. Auf p. 280 meiner Arbeit habe ich dagegen erwähnt, daß ich durchgängig Fälle aussuchte, bei denen der Auswurf frei von Begleitbakterien war. Von 2 Fällen, bei denen der Auswurf andere Bakterien aufwies, zeigte sich eine Kultur (F I) wenig virulent, die andere freilich (V. II) erheblich virulenter. Bei allen übrigen Fällen hat gar keine Mischinfektion bestanden, besonders nicht durch Streptokokken, die der mikroskopischen und kulturellen Untersuchung sicher nicht entgangen wären.

Nach wie vor muß also daran festgehalten werden, daß auch bei den Tuberkelbacillen menschlicher Lungentuberkulose ganz erhebliche Virulenzunterschiede bestehen, die für den klinischen Verlauf des Falles und seine Infektiosität, sagen wir Gemeingefährlichkeit, von der größten Bedeutung sein können.

Auf jede subtile Klassifikation der Virulenz kann man meiner Meinung nach dieser wichtigen, von mir zuerst festgestellten Tatsache gegenüber ruhig verzichten.

Als nebensächlich will ich übrigens noch bemerken, daß mir Verff. zu Unrecht vorwerfen, ich habe einen Tuberkulosestamm (XXIV. S. Z. No. 55 u. 56 meiner Liste) einmal der II., ein anderes Mal der III. Virulenzklasse zugezählt. Ich sage p. 293 ausdrücklich: „Die II. Klasse mittlerer Virulenz umfaßt diejenigen, die in einer Menge von $\frac{1}{4}$ mg injiziert, zwar zahlreiche Knoten in den Lungen, aber nicht in den übrigen inneren Organen verursachen, oder die zu 5—10 mg in die Blutbahn gebracht, eine allgemeine Miliartuberkulose verursachen“, und „zur III. Klasse endlich rechnen die Stämme, von denen $\frac{1}{4}$ mg nur zu spärlicher Knotenbildung in den Lungen oder eine größere Menge — bis 10 mg — zu reichlicherer Knotenbildung, aber nur in den Lungen, Veranlassung gibt“. In No. 55 hat nun die Kultur XXIV zu $\frac{1}{4}$ mg injiziert, zahlreiche Knoten in den Lungen erzeugt, während die übrigen Organe makroskopisch frei waren, in Versuch No. 56 zu 10 mg starke allgemeine Tuberkulose verursacht. Folgerichtig habe ich diesen Stamm also der II., aber nie der III. Klasse zugerechnet. Doch ich erwähnte schon, daß ich mich nie an die Klassifikation klammern würde, die ich nur deshalb gab, um die Uebersicht zu erleichtern.

Nachdruck verboten.

Ueber die Aetiologie von „Ekiri“, einer eigentümlichen, sehr akuten, ruhrartigen, epidemischen Kinderkrankheit in Japan¹⁾.

Von Dr. **Sukehito Ito** aus Fukuoka (Japan).

Einleitung.

In Japan, besonders auf Kiushiu (Insel) und in Nagoya (Stadt), herrscht seit langer Zeit, wohl seit mehreren Hundert Jahren, eine eigentümliche Kinderkrankheit, welche sehr akut verläuft. Daher wird die Krankheit auf Kiushiu im Volksmunde „Kuishō“ — das bedeutet akute Erkrankung — und in Nagoya von den Leuten „Hayate“ (Orkan) genannt²⁾. Wir sehen also, daß, wenn auch an den beiden räumlich weit entfernt liegenden Orten vom Volke für dieselbe Krankheit ein anderer Ausdruck gewählt wurde, derselbe doch in beiden Fällen das bezeichnet, was dem Laien am augenfälligsten an der Epidemie erscheint. Als medizinischer Ausdruck aber wird der Name „Ekiri“ (d. h. epidemische Ruhr) von den meisten Autoren gebraucht, weil die Krankheit einen ruhrartigen und epidemisch auftretenden Charakter hat, wie ich unten weiter kennzeichnen werde.

Die Krankheit ergreift fast nur Kinder, ausnahmsweise Erwachsene; ich habe unter über 300 Fällen nur 3mal „Ekiri“ bei Erwachsenen beobachtet. Weil die Krankheit „Ekiri“ nicht nur vom Verfasser, sondern auch von allen übrigen Autoren (z. B. hat Murao unter 105 Fällen nur 2 Fälle bei Erwachsenen gesehen) nach der japanischen Literatur fast ausschließlich bei Kindern beobachtet wird, so wird diese Krankheit seit langen Jahren für eine spezifische Kinderkrankheit gehalten.

Das am meisten für diese Krankheit disponierte Alter ist 4—6 Jahre. Je älter die Kinder sind, desto weniger sind sie dafür disponiert; und wenn sie schon das 13. Jahr erreicht haben, so leiden sie so selten daran, wie die Erwachsenen. Auch Säuglinge werden sehr selten von „Ekiri“ ergriffen; bei Kindern unter 10 Monaten ist diese Krankheit noch niemals beobachtet worden.

Die Krankheit herrscht epidemisch am Ende des Sommers und am Anfang des Herbstes; aber sie kommt im Hochsommer und selbst auch im kältesten Winter vor, d. h. eigentlich zu allen Jahreszeiten ohne Ausnahme. Daß „Ekiri“ infizierbar ist, wird durch die Tatsache bewiesen, daß mehrere Individuen derselben Familie hintereinander daran erkrankten, was von vielen Autoren und von mir selbst beobachtet wurde.

Was die klinischen Erscheinungen und pathologisch-anatomischen Veränderungen anlangt, so möchte ich nur die wichtigeren kurz³⁾ erwähnen:

Bisher scheinbar ganz gesunde Kinder bekommen plötzlich Fieber und gleichzeitig 1—2malige Stuhlentleerung von weicher Konsistenz mit unverdauten Nahrungsresten. Zunächst tritt hohes Fieber ein, gewöhnlich über 40, selbst bis 42° C, und schleimige Stühle, häufig mit kleinen

1) Diese Arbeit ist auch in Kitasatos Zeitschr. f. Bakt. japanisch publiziert.

2) Ueber die Identität der Kuisho und Hayate vergl. die Arbeit von Otsuki.

3) Genaueres habe ich schon in japanischen medizinischen Zeitschriften veröffentlicht.

Mengen Blut gemischt; die Stuhlgänge sind in der Regel nicht frequent und führen keinen Tenesmus¹⁾ herbei. In diesem Stadium kommt Konvulsion als fast konstante Erscheinung vor, welcher Koma folgt. (Bei älteren Kindern fehlt die Konvulsion meist, aber Koma tritt immer auf.)

Die Krankheit verläuft sehr akut und die Kinder gehen gewöhnlich in 20—24 Stunden nach dem Ausbruch der Krankheit zu Grunde, in den akutesten Fällen aber schon binnen 10 Stunden. Selbst relativ chronisch verlaufende Fälle, welche sehr selten zu unserer Beobachtung kommen, dauern höchstens 3—4 Tage. Wenn die Krankheit günstig verläuft, so heilt sie nach wenigen Tagen ganz ab. Wirklich chronische, d. h. wochenlang dauernde Formen, sind wohl äußerst selten; ich wenigstens habe keinen einzigen solchen Fall kennen gelernt.

Die Prognose ist eigentlich nicht günstig; früher erlag über die Hälfte der Patienten der Erkrankung. In den letzten Jahren ist die Prognose jedoch, wegen der Fortschritte der medizinischen Wissenschaften, viel günstiger geworden, doch beträgt die Mortalität der Kranken immer noch über 30 Proz.

Resumiert man die Hauptsymptome von „Ekiri“, so ergibt sich folgendes:

1) ganz plötzlicher Eintritt der Krankheit, 2) hohes Fieber (meist über 40° C), schleimige Stühle (häufig mit Blutbeimengung, sehr selten Tenesmus), 4) Krampf, dann Koma (bei älteren gleich Koma ohne vorausgehenden Krampf) und 5) Tod durch Herzlähmung, nicht durch Kollaps.

Die pathologisch-anatomischen Befunde sind relativ mangelhaft, weil bis jetzt nur 99 Fälle (darunter 3 vom Verfasser) seziert sind. Die Veränderungen, welche von allen Autoren angegeben sind, stimmen jedoch fast ganz überein, und zwar sind sie nichts anderes als akute und hochgradige Enteritis follicularis.

Ueber die Genese dieser Krankheit mit den oben genannten klinischen und pathologisch-anatomischen Charakteren haben die Autoren verschiedene Ansichten. Manche glauben, daß „Ekiri“ nichts anderes als akute Dysenterie bei Kindern sei; sie betonen hierbei eine gewisse Aehnlichkeit der Symptome beider Krankheiten, und zwar hauptsächlich die schleimigen Stühle²⁾ und außerdem die Tatsache, daß mit der „Ekiri“-Epidemie nicht selten eine Dysenterieepidemie zugleich auftritt. Andere aber, z. B. Hirota und Segawa, halten wegen der pathologisch-anatomischen Befunde und unter noch genauerer Beobachtung der Symptome und des Verlaufes der Krankheit „Ekiri“ für eine Art von Enteritis follicularis. Entschieden ist aber dieser Streit bis jetzt noch nicht.

Um die Frage zu beantworten, ob „Ekiri“ mit der Dysenterie, welche in Japan herrscht, und als deren Erreger Shiga's Dysenteriebacillus (1897) von fast allen Autoren in Japan mit Recht angenommen wird, identisch ist oder nicht, müssen außer klinischen und pathologisch-anatomischen Forschungen auch noch ätiologische resp. bakteriologische Untersuchungen gemacht werden. Segawa hatte 1897 zuerst die Stühle von Ekirikranken bakteriologisch untersucht; er hatte aber keine pathogenen, als Erreger annehmbare Mikroorganismen darin gefunden. Er konnte daher bakteriologisch diese Krankheit nicht von der Dysenterie unterscheiden; denn Shiga's Entdeckung war damals noch nicht veröffent-

1) Tenesmus kommt nur ausnahmsweise vor.

2) Nach meiner Erfahrung ist es in den meisten Fällen möglich, die Beschaffenheit der Stühle bei der Krankheit zu differenzieren.

licht. Ich selbst habe im April 1898 eine eigentümliche pathogene Bakterienart in den Stühlen von Ekirikranken gefunden, welche von mir für den Erreger der „Ekiri“ gehalten, „Ekiribacillus“ genannt wurde. Auf dem medizinischen Kongreß in Kiushiu ist das Resultat meiner Untersuchungen veröffentlicht worden. Es ist durch spätere Arbeiten anderer Autoren¹⁾ und durch weitere Studien vom Verfasser seitdem immer wahrscheinlicher geworden, daß der sogenannte „Ekiribacillus“ wohl als der Erreger der „Ekiri“ anzusehen sei und daß folglich „Ekiri“ eine ganz andere Krankheit als Dysenterie ist. Ich möchte nun Näheres darüber angeben.

Kapitel I.

Untersuchung über die Uebertragbarkeit des im Stuhl von Ekirikranken enthaltenen Giftes.

Ich habe oben bereits an klinischen Symptomen und durch pathologisch-anatomische Veränderungen nachgewiesen, daß „Ekiri“ zweifellos eine Darmkrankheit ist, und zwar eine epidemisch auftretende, und nach den Erfahrungen vieler Autoren wie auch nach meinen eigenen ist „Ekiri“ sogar mit großer Wahrscheinlichkeit als eine Infektionskrankheit anzusehen. Daher vermutete ich, daß wohl irgend ein Krankheitserreger im Darmtraktus lokalisiert sei und mit den Stuhlgängen entleert würde. Diese Annahme zu bestätigen, hatte ich mit dem Stuhl eines Ekirikranken verschiedene Tiere gefüttert, während ich gleichzeitig bemüht war, in demselben Stuhl gewisse, als Krankheitserreger annehmbare pathogene Mikroorganismen zu entdecken. Dieser Stuhl stammt von einem Kranken, dessen Geschichte ich in Kürze mitteile:

Krankengeschichte:

M., 10-jähriger Knabe.

Anamnese: Am 12. März 1898 nachts bekam der Knabe plötzlich hohes Fieber, Diarrhöe bis zum nächsten Morgen über 10mal. Beschaffenheit der Stühle und Vorhandensein von Tenesmus waren unklar. Ein Arzt hatte Kalomel verordnet; bis 4 Uhr nachmittags desselben Tages 10mal Stuhlgänge ohne Tenesmus. Die Stühle waren grünlich, blutig-schleimig und mit einer relativ großen Menge gelblichbrauner, klarer Flüssigkeit (serös). Am nächsten Morgen wurde der Puls sehr klein und schwach; leichte Konvulsion. Um 4 Uhr nachmittags hatte Verfasser den Kranken untersucht.

Status praesens: Mittelmäßige Konstitution, blaß, soporös. Puls schwach, klein, frequent, 150—160 in der Minute. Bauch überall weich, keine resistente Stelle. Körpertemperatur 30,5° C.

Verlauf: Als Behandlung sogleich Ausspülung des Darmes mit großen Mengen (über 20 l) lauwarmen Wassers. Nach der Ausspülung bis zum nächsten Morgen 6mal schleimige Stühle, aber nicht mehr mit Blutbeimengung. Puls kaum kräftiger als früher, 140—150 in der Minute. Bewußtsein klarer, aber nicht ganz normal. Temperatur 38,5° C.

Ausgang: Nach einigen Tagen vollständig geheilt.

Anmerkung: Weder in der Stadt, wo der Kranke wohnte, noch in deren Umgebung herrschte eine Dysenterieepidemie. Der Kranke reiste auch niemals.

1) Otsuki, Assistent an der Universitäts-Kinderklinik zu Tokyo, hat unter der Leitung des Direktors, Prof. Hirota, die ätiologische Erforschung der Ekirikrankheit in Nagaya — wo Ekiri „Hayate“ genannt wird — unternommen. Er fand in mehreren Ekirifällen immer denselben pathogenen Bacillus, welcher mit meinem Ekiribacillus in allen Punkten übereinstimmt, und sehr wahrscheinlich mit ihm identisch ist. Otsuki bestätigte schließlich meinen Bacillus als Ursache der Ekirikrankheit und wies ferner die Identität von „Ekiri auf Kiushu“ und „Hayate in Nagoya“, nachdem seit langer Zeit schon von fast allen japanischen Klinikern beide Krankheiten, Ekiri und Hayate, für identisch gehalten worden waren, bakteriologisch und ätiologisch nach.

Tierexperiment:

1) Hahn (α), Körpergewicht 620,0 g. 15. März 1898, 11 Uhr vormittags, 3 Platinösen des schleimigen Stuhls des Ekirikranken mit Reis zusammen gefüttert.

Verlauf: 16. März 1898, $\frac{1}{4}$ 9 Uhr vormittags untersucht. Tier ist matt. Seit der letzten Nacht 9mal Diarrhöe; die Stühle, besonders die älteren, sind fast rein schleimig und innig mit Blut von großer Menge gemischt; nur fleckenweise sind ganz spärliche Kotmassen beigemischt. Die frischen Stühle bestehen auch größtenteils aus Schleim mit Blutflecken.

Ausgang: Nach kurzer Dauer dieser Erscheinungen ganz geheilt.

2) Hahn (β), Körpergewicht 720,0 g. 18. März 11 Uhr vormittags, hanfkorngroße Masse von blutig-schleimigem Stuhl, welchen der erste Hahn entleert hatte, mit Reis gefüttert.

Verlauf: 19. März 9 Uhr vormittags untersucht. Seit der letzten Nacht 3—4mal Diarrhöe, wässrig und sehr reichlich, mit mäßiger Menge von Schleim und wenigem Blut.

Ausgang: Nach kurzem geheilt.

3) Meerschweinchen [No. 5¹⁾], Körpergewicht 560,0 g.

15. März $\frac{1}{3}$ Uhr nachmittags, 3 Platinösen voll Schleim vom Stuhl des Kranken mit „Tofukasu“ (einer japanischen, aus Bohnen bereiteten Speise) gefüttert.

Verlauf: 16. März $\frac{1}{2}$ 9 Uhr vormittags untersucht. Das Tier ist außerordentlich matt und hockt in einer Ecke des Stalles. Nötigt man das Tier durch Stoßen oder Schlagen mit einem Stock zur Bewegung, so kriecht es nur mit den vorderen Extremitäten und schleppt die hinteren (motorisch total gelähmten) nach. Um $\frac{1}{6}$ 6 Uhr abends aber hat sich die Lähmung der hinteren Extremitäten schon gebessert und das Tier ist im allgemeinen lebhafter geworden.

Ausgang: Allmählich geheilt.

4) Kaninchen, Körpergewicht 2980,0 g. 15. März vormittags, 3 Platinösen voll Schleim vom Stuhle des Kranken mit Speise aus Bohnen gefüttert.

Verlauf: $\frac{1}{10}$ 10 Uhr nachmittags untersucht. Stuhl weicher als normal, d. h. Kotmasse nicht einzeln entleert, sondern 7 oder 8 Stücke rosenkranzartig aneinander gehängt. Sonst keine merklichen Veränderungen.

„Nach diesen Resultaten kann man wohl mit Recht annehmen, daß irgend welche giftigen Stoffe resp. gewisse pathogene Mikroorganismen in den Stühlen der Ekirikranken enthalten sein müssen; denn die Ergebnisse der Experimente mit den Hähnen lassen die Tatsache der Infektion von Mensch zu Tier und von Tier zu Tier erkennen.“

Kapitel II.

Isolierung des Ekiribacillus.

Ehe ich die künstlichen Nährböden mit dem schleimigen Stuhl des im vorigen Kapitel bezeichneten Ekirikranken infizierte, um spezifische, pathogene Mikroorganismen darin zu finden resp. zu isolieren, hatte ich denselben mikroskopisch untersucht. Die vielen mikroskopischen Präparate, welche mit verschiedenen Anilinfarbstoffen gefärbt waren, zeigten fast nur *Bacterium coli* ähnliche Bakterien; sie sehen aus wie Reinkulturen. Aber die Anzahl der Bakterien in dem einzelnen Präparat war nur relativ spärlich. Amöben hatte ich nicht wahrgenommen.

Nach diesem Befunde vermutete ich, daß die spezifischen Krankheitserreger von „Ekiri“ vielleicht eine Art von *Coli*-Bacillen seien; deshalb hatte ich gehofft, analog der Isolierungsmethode des Typhusbacillus in dem Stuhl des Typhuskranken, auch pathogene Bakterien im Ekiristuhl zu finden.

Ich habe eine Portion (eine Oese voll) des Schleims vom Ekiristuhl in den schräg erstarrten Agarnährboden infiziert und aus dem Originalröhrchen der Reihe nach eine 5malige Verdünnung vorgenommen. Die 6 infizierten Röhrchen wurden in den Brutschrank gestellt und nach 24 Stunden wieder untersucht.

1) Vergl. Kapitel III „Tierexperiment“ mit Ekiribacillus.

Die Entwicklung der Kolonien auf der Oberfläche jedes Nähragars entsprach der Verdünnung. In der dritten Verdünnung entwickelten sich 12 Kolonien, nach deren makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung ich alle Kolonien für zum Coli-Bacillus gehörige Bakterien halten mußte.

Jede der 12 Kolonien hatte ich in 3 verschiedene Nährböden eingepft, nämlich: Bouillon- (mehrere Röhrchen), Milch- und Traubenzuckeragar-Cylindernährböden. Außerdem hatte ich jede Bouillonkultur, nachdem sie 24 Stunden lang im Brutschrank gestanden, zu Tierexperimenten verwendet, um den eventuellen Giftgehalt einzelner Bakterienarten zu untersuchen, resp. um pathogene Bakterien im Ekiristuhl festzustellen.

Bei diesen Tierexperimenten erzielte ich nur in einem Fall ein positives Resultat, welches ich in dem entsprechenden Kapitel (IV) erklären werde. Die Coliähnlichen Bakterien dieses Falles, welche unter den 12 Kolonien allein pathogen waren, habe ich vorläufig als die spezifischen Krankheitserreger der „Ekiri“ angenommen und die Morphologie, ihr Verhalten auf künstlichen Nährböden, die pathogenen Eigenschaften für verschiedene Tiere und die Widalsche Reaktion derselben weiter studiert. Die Resultate möchte ich weiter unten schildern.

Kapitel III.

Morphologie und Eigenschaften des „Ekiribacillus“.

1) Morphologie. Der „Ekiribacillus“ ist ein kurzes, plumpes Stäbchen mit abgerundeten Enden, welches gewöhnlich einzeln liegt, zuweilen jedoch auch paarweise auftritt. Beide Enden färben sich durch Methylenblau intensiver als das Mittelstück und sehen dann oft wie ein Diplococcus aus.

Geißeln konnte ich nicht färben.

2) Färbung. Mit allen Anilinfarbstoffen gut färbbar. Vom 3. Tage ab (nach Verpflanzung auf den Agarnährboden) wird die Färbbarkeit der Bacillen schwächer. Da die jüngsten Bacillen intensiv gefärbt sind, je nach dem Alter aber der Grad der Färbung abnimmt, so zeigen die Deckglaspräparate aus der Reinkultur auf dem Agarnährboden ungleichmäßige Färbung der einzelnen Bacillen.

3) Grams Methode. Negatives Resultat.

4) Bewegung. Lebhaftige Eigenbewegung (lebhafter als Coli-Bacillen).

5) Sporen. Nicht gebildet.

6) Gelatinenährboden. Nicht verflüssigt.

7) Verhalten bei verschiedener Temperatur. Bei Zimmertemperatur (18–20° C) gute, bei Bluttemperatur bessere Entwicklung.

8) Gelatineplattenkultur. Schon nach 24 Stunden haben sich makroskopisch sichtbare Kolonien gebildet. Die Kolonien auf der Oberfläche sind rundlich, glänzend und feucht wie Tautropfen. Unter dem Mikroskop zeigt die Kolonie rundliche Form mit zwar regelmäßigem aber verschwommenem Rande; der Inhalt ist granuliert.

Die jungen Kolonien sind farblos, aber parallel mit ihrer Entwicklung werden sie gelblich und endlich bräunlich gelb.

9) Bouillonkultur. Nach 24 Stunden ist die ganze Flüssigkeit getrübt und mehr oder weniger mit einem Bodensatz von weißen Flecken versehen. Auf der Oberfläche der Flüssigkeit bildet sich ein zartes, weißlichgraues Häutchen.

10) Peptonwasser. Schon nach 24 Stunden geprüft, aber nicht so

deutlich wie bei der Bouillonkultur. Später, vom 3. Tage an, deutliche Trübung.

11) Strichkultur auf der Oberfläche des Nähragars. Nach 36 Stunden entwickeln sich rundliche, weiße, feuchte, transparente, bei durchfallendem Licht mehr oder weniger bläulich schimmernde Kolonien. Die jüngeren sind Tautropfen vergleichbar.

12) Strichkultur auf schräg erstarrtem Nähragar. Nach 24 Stunden entwickelt sich die Kolonie bandförmig. Sie ist weiß, feucht, transparent; die dünne Schicht am auslaufenden Ende sieht bei durchfallendem Licht mehr oder minder bläulich aus. Oft entwickeln sich Gase und zerreißen den Nährboden.

13) Gelatinestichkultur. Der Stichlinie entlang entwickeln sich die Kolonien und zeigen eine grauweiße Linie.

14) Traubenzuckeragar - Cylinderstichkultur. Die Kolonien sind denen der Gelatinestichkultur ähnlich. Gasentwicklung ist stark.

15) Kartoffelkultur. Es bildet sich eine gelblich-braune Membran.

16) Indolreaktion. Tritt auffallend später auf als beim Coli-Bacillus, wie folgende Resultate beweisen:

1. Versuch: Bouillonkultur bei Zimmertemperatur.

Verlauf	Ekiribacillus	Colibacillus	Nicht pathogene Coliart im Ekirstuhl
Am 2. Tage	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion
" 4. "	" "	sehr schwache R.	" "
" 6. "	wenig bräunlich-rot	schöne violette Farbe wie Veilchen	" "
" 7. "	hellrot	tief violett	" "
" 8. "	rot	" "	" "
" 9. "	hell purpurrot	" "	" "
" 40. "	tief "	" "	" "

2. Versuch: Bouillonkultur bei Bluttemperatur.

Nach	Ekiribacillus	Colibacillus
24 Stunden	keine Reaktion	schwach hellrot
48 "	" "	hellrot
72 "	schwach hellrot	violett
96 "	hellrot	tief violett

3. Versuch: Peptonwassserkultur bei Bluttemperatur.

Nach	Ekiribacillus	Colibacillus
24 Stunden	keine Reaktion	wenig rötlicher als das Wasser
48 "	kaum rötlicher als das Wasser	hellrot
72 "	mehr oder weniger rötlich als das Wasser	rötlich
96 "	schwach hellrot	violett
120 "	hellrot, und zwar genau wie eine 48-stündige Colikultur	tief violett

Anmerkung: Bei der Bouillonkultur wird die Farbe der Reaktion nach dem Versuch allmählich blässer. Bei Pepton wird die Farbe dagegen immer intensiver.

17) Milchkultur. Der „Ekiribacillus“ läßt den Milchnährboden niemals gerinnen, wenn er auch mehrere Wochen lang im Brutschrank gestanden, oder bei Zimmertemperatur aufbewahrt war, während Coli-Bacillen diesen Nährboden (zur Kontrolle) ausnahmslos nach einigen

Tagen gerinnen lassen. Diesen Versuch habe ich vielmals wiederholt und immer dieselben Resultate bekommen.

Ich stelle zum Schluß dieses Abschnittes die oben angeführten Eigenschaften des „Ekiribacillus“ tabellarisch zusammen und gebe zur klaren Uebersicht und zum Zwecke des Vergleiches die Beobachtungen an anderen ähnlichen Bacillen daneben:

	Eigenbewegung	Gasentwicklung	Indolreaktion	Milchgerinnung
Ekiribacillus	lebhaft	+	+ (auffallend spät. auftretend)	—
Colibacillus	mäßig	+	+	+
Dysenteriebacillus Shigas	träge	—	—	—
Typhusbacillus	lebhaft	—	—	—

Kapitel IV. Tierexperiment. 1. Versuch. Maus.

Nummer der Tiere	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
Bacillenarten	Ekiribacillus	Ekiribacillus	Colibacillus	Colibacillus	Toxin vom Ekiribacillus
Alter der Bouillonkultur	3. Tag nach der Züchtung	3. Tag n. d. Z.	3. Tag n. d. Z.	3. Tag n. d. Z.	20 Minuten lang unter 60° C gehalten
In die Bauchhöhle eingespritztes Quantum	0,1 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm
Resultat	Tod nach 41 Stunden	Tod binnen 40 Stunden	kein Einfluß	kein Einfluß	am nächsten Tage hintere Extremitäten motorisch gelähmt u. Lauffähigkeit geschwunden. Vom 3. T. allmählich erholt
Pathologisch-anatomischer Befund	Eingespritzte Stelle hyperämisch infiltriert; kleine Menge von seröser Flüssigkeit in der Bauchhöhle. Im Blut Ekiribacillus nachgewiesen.		—	—	—

2. Versuch s. p. 516.

3. Versuch. Kaninchen (Körpergewicht 1020,0 g)

2,0 ccm einer 4 Tage alten Bouillonkultur des Ekiribacillus wurden in die Bauchhöhle des Kaninchens eingespritzt. Das Tier war nach 17 Stunden tot. Bei der Sektion sah man eine mittelmäßige Menge von seröser Flüssigkeit und reichlichen, grünlichen Schleim im Dickdarm. In der serösen Flüssigkeit, Leber, Milz und im Blut wurden zahllose Ekiribacillen nachgewiesen. (Segawa hatte mit 20,0 ccm Bouillonkultur vom Coli-Bacillus, welcher aus Ekirikranken stammte, am Kaninchen Versuche gemacht; das Tier war gesund geblieben.)

4. Versuch. Hahn.

1,0 ccm Bouillonkultur des Ekiribacillus, die 2 Tage alt war, hatte ich mit der Sonde (Katheter) in den Magen des Hahnes eingeführt. Er bekam in der Nacht mehrere Male Diarrhöe in reichlicher Menge. Am nächsten Tage tötete ich ihn. Bei der Sektion konnte ich allgemeine Hyperämie der Schleimhaut des Dickdarmes und sogar deutliche Katarrherscheinungen nachweisen.

2. Versuch. Meerschweinchen (Körpergewicht etwa 400,0 g).

Nummer der Tiere	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5 ¹⁾	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9
Arten der Bakterien	Ekitri-bacillus	Ekitri-bacillus	Ekitri-bacillus	Ekitri-bacillus	Ekitri-bacillus	Coli-bacillus	Coli-bacillus	Coli-bacillus	Coli-bacillus
Alter der Bouillonkultur	2. Tag	2. Tag	3. Tag	3. Tag	2. Tag	2. Tag	3. Tag	3. Tag	3. Tag
In die Bauchhöhle eingespritztes Quantum	0,5 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	1,0 ccm	2,0 ccm	3,0 ccm
Resultat	ohne Einfluß	Tod binnen 17 Stunden	Tod binnen 20 Stunden	Tod binnen 17 Stunden	ohne Einfluß	kein Einfluß	kein Einfluß	kein Einfluß	Nach 24 Stunden gestorben
Pathologisch-sanatomischer Befund	—	Eingespitzte Stelle stark hyperämisch und infiltriert. Die Bauchhöhle enthält eine große Menge seröser Flüssigkeit. Darin sowie in Leber, Milz und Blut wurden Ekitribacillen massenhaft nachgewiesen.			—	—	—	—	Eingespitzte Stelle wenig hyperämisch. Ganz kleine Menge seröser Flüssigkeit in der Bauchhöhle. In der Flüssigkeit, Leber, Milz und im Blut absolut keine Mikroorganismen nachzuweisen. Die Todesursache war überhaupt ganz unklar.

1) Dieses Tier war vor einer Woche durch Fütterung mit dem Stuhl des Ekitrikranken vergiftet und besaß also wohl eine gewisse Immunität gegen den Ekitribacillus.

5. Versuch. Taube.

1,0 ccm 4 Tage alte Bouillonkultur des Ekiribacillus wurde in die Bauchhöhle der Taube injiziert. Sie wurde am nächsten Tage sehr matt; Appetit war fast gar nicht vorhanden, fliegen konnte sie nicht. Vom 3. Tage an erholte sie sich allmählich.

Durch diese wiederholten Versuche an verschiedenen Tieren ist also zweifellos festgestellt, daß der Ekiribacillus ein pathogener ist. Ob er aber wirklich mit der Ekirikrankheit in ätiologischem Zusammenhang steht, das zu beurteilen, habe ich die Widalsche Reaktion dieses Bacillus genau studiert, was ich im nächsten Kapitel ausführen werde.
(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Les Epithéliomas parasitaires. La clavelée et l'Epithélioma claveleux.

Par F. J. Bosc, Professeur à l'université de Montpellier.

Avec 3 planches et 6 figures.

(Fortsetzung.)

2. Caillette. Avec les pustules de la caillette nous abordons l'étude des lésions claveleuses glandulaires. La caillette reproduit en effet à peu près le type de l'estomac de l'omnivore. Dans les cas de généralisation intense, on trouve, et surtout dans la région pylorique, une éruption de pustules rondes, saillantes, un peu aplatées, dures, d'un gris nacré, du volume d'une tête d'épingle à un petit pois. Les plus volumineuses sont ombiliquées et ressemblent exactement à une belle pustule de variole. Elles sont isolées ou agminées et dans ce dernier cas elles forment un placard saillant qui peut présenter une exulcération centrale. Celle-ci gagnant en surface et en profondeur forme des ulcérations à bords taillés à pic, à fond détergé, du diamètre d'une pièce de cinquante centimes et de un franc, qui reproduisent l'aspect exact de l'ulcère simple de l'estomac.

A l'examen histologique, les pustules pyloriques de petite taille sont formées par la prolifération des cellules épithéliales des tubes glandulaires et le bourgeonnement de ces derniers aboutissant à une néoformation glandulaire adénomateuse (figure 3). Les cellules épithéliales subissent ici, comme au niveau du revêtement malpighien, la même hypertrophie claire (*x, x* figure 3); les unes aboutissent à un développement colossal et compriment les autres qui se déforment et demeurent plus sombres. Elles se disposent sur plusieurs rangs, les figures de karyokinèses sont très abondantes et désorientées pour la plupart (*t, t, t* figure 3); à la périphérie elles donnent naissance à des bourgeonnements et à des amas (*bo, bo, s, s* figure 3) qui formeront de nouveaux tubes (*al, al* figure 3). Cette prolifération prend les caractères de plus en plus prononcés de l'adénome, à mesure que l'on étudie des pustules plus volumineuses, pour aboutir à l'adénome envahissant et à l'adéno-épithéliome (figure 4). Dans ce cas, l'ensemble de la pustule est constitué par une prolifération adénomateuse formée de tubes et d'acini tassés les uns contre les autres, émettant des bourgeons et des culs de sac (*m, m, d, d, lob* figure 4) intriqués et qui formés de rangées cellulaires multiples constituent de nouveaux tubes à lumière irrégulière et à couches nombreuses de cellules (*a, a, a* figure 4). Dans la profondeur, les néoformations adénomateuses pénètrent dans le tissu conjonctif (*no, no'* figure 4) modifié par une infiltration embryonnaire néovasculaire. Elles constituent des amas renfermant des acini à plusieurs rangées de cellules et des bourgeons pleins à cellules atypiques reposant encore sur une basale (*s* figure 4). Mais les plus profondément situés de ces amas sont formés de cellules épithéliales atypiques, volumineuses, sombres et à gros noyau ou claires et colossales (*tub, tub* figure 4), écrasant et déformant d'autres cellules très sombres; les cellules reposent

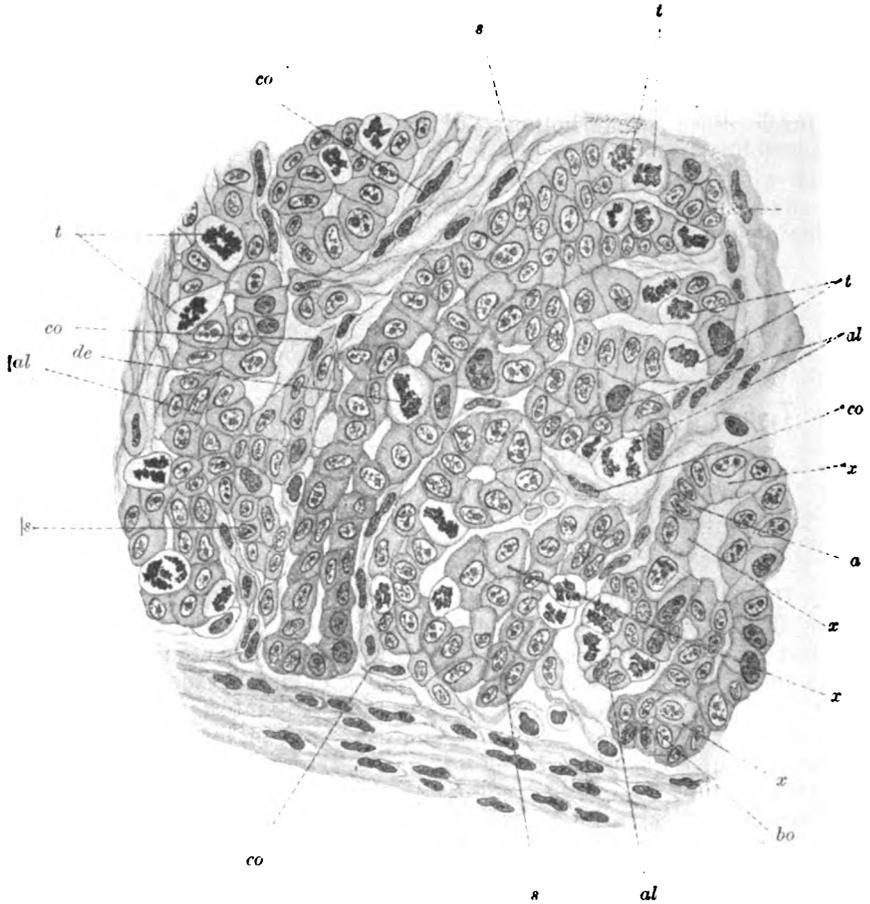


Figure 3. Coupe d'une pustule de l'Estomac (caillette). — Elle est formée par une prolifération adénomateuse des glandes pyloriques qui émettent des bourgeonnements (*bo*) ou des cordons pleins (*ss*) formés de cellules sombres ou en hypertrophie claire (*x, x, x*) et qui finissent par s'orienter autour d'une lumière pour former des alvéoles nouveaux (*al, al, al*). Les karyokinèses sont très nombreuses et désorientées (*t, t, t, t*); en *co, co, co* grandes cellules conjonctives.

directement sur la trame conjonctive et l'on constate qu'elles sont développés dans des espaces conjonctifs distendus (*x* figure 4). Ces amas envoient en effet des cellules dans les espaces conjonctifs voisins et ces cellules qui en proliférant donnent naissance à leur tour à des boyaux et à des lobules de cellules atypiques (*cp* figure 4).

Les ulcérations sont dues à une nécrose en entonnoir aboutissant à l'élimination de la totalité du tissu adénomateux qui constituait la pustule (suivant un processus identique à celui que nous décrirons pour la pustule cutanée et les pustules en général).

D. Lésions du poumon.

Les lésions du poumon se présentent sous 4 formes principales: une forme pustuleuse, la plus fréquente, une forme en trainées irrégulières plus ou moins anastomosées, développées le long des ramifications bronchiques, une forme granulique et une forme en îlots ou en amas pseudolobaires.

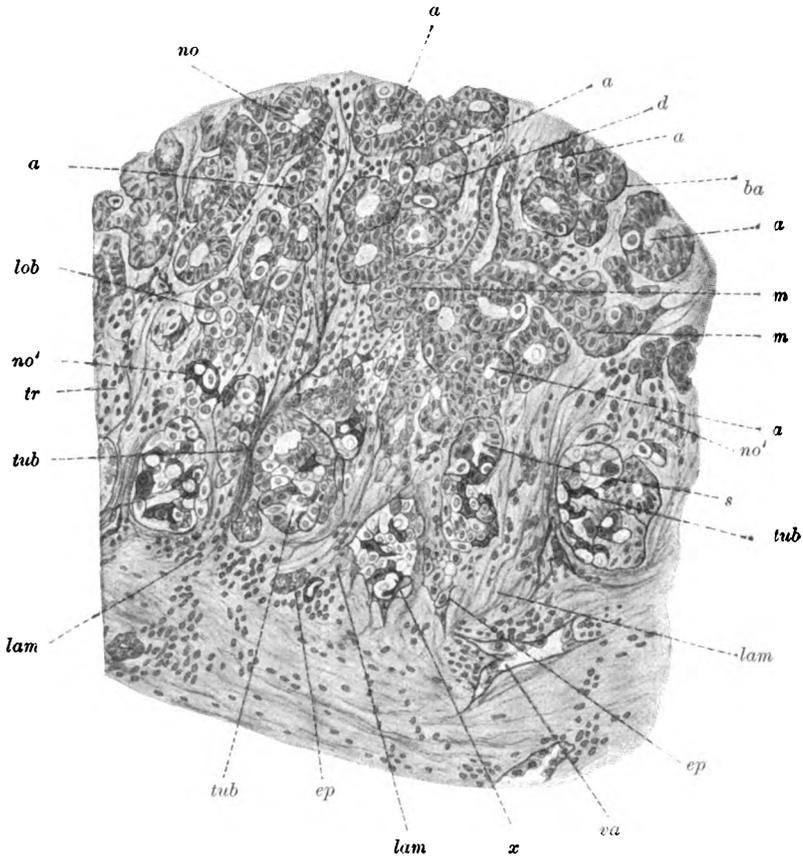


Figure 4. Coupe d'une pustule de l'estomac (caillette). — Prolifération adénomateuse avec prolifération adéno-épithéliomateuse profonde. Les tubes adénomateux à couches multiples et à lumières excentriques (*a, a, a*) sont tassés en amas dans un tissu conjonctif embryonnaire (*no, no'*); ils donnent naissance à un bourgeonnement épithélial (*m, m*) autour desquels la basale est de moins en moins marquée. Dans le tissu conjonctif profond (*lam, lam*) la prolifération épithéliale donne naissance à des amas de cellules atypiques (*tub, tub, tub*); tout à fait dans la profondeur les cellules atypiques constituent des boyaux (*x*) ou des trainées (*ep*) dans les espaces conjonctifs.

La forme pustuleuse est la plus typique: les pustules sont disséminées sous la plèvre et dans l'épaisseur du parenchyme, parfois rares, parfois confluentes de sorte que le poumon donne l'impression d'un sac de pois; leur volume varie d'une tête d'épingle à une noix. Les pustules sous pleurales font une saillie aplatie, d'un gris translucide; elles sont résistantes et nettement limitées dans un parenchyme d'aspect normal ou emphysémateux; ces pustules s'enfoncent dans le tissu pulmonaire comme une véritable tumeur arrondie formée par un tissu compact, ferme mais très friable, gris rosé ou gris violacé; la surface de coupe des pustules volumineuses offre l'aspect d'une section d'un nodule d'encéphaloïde, d'autant que les pustules clavelleuses peuvent ne présenter aucune zone congestive périphérique.

A l'examen histologique, on constate que la lésion naît au niveau de l'épithélium bronchique qui forme d'énormes bourgeons de 15 à 20 rangées de cellules

hypertrophiées, complètement atypiques et capables de remplir la lumière de la bronche (bo figure 2, pl. I). Les cellules épithéliales alvéolaires subissent une prolifération karyokinétique et une hypertrophie volumineuse, de sorte que l'alvéole finit par être rempli et distendu par des cellules atypiques, les unes sombres, les autres en volumineuse hypertrophie claire (*alr, apl, apl* fig. 2, pl. I). Il existe, en somme, une prolifération désordonnée et atypique des épithéliums bronchique et alvéolaire identique à celle qui caractérise l'épithélioma, sauf que les basales sont conservées. Dans le tissu péri-bronchique, il existe une infiltration d'énormes cellules conjonctives claveuses (*cl, cl* fig. 2, pl. I) qui dérivent en partie (*en* fig. 2, pl. I) de cellules endothéliales hypertrophiées (endovascularite intense).

Dans les pustules plus volumineuses, les proliférations alvéolaires s'étendent et s'amplifient pour aboutir à la formation d'un adénome alvéolaire typique et étendu du poumon (pl. III, fig. 2). La coupe est formée par de petites cavités arrondies ou polygonales tassées les unes contre les autres (*al, al* fig. 2, pl. III), limitées par une paroi de cellules fusiformes à gros noyau (*n, n* fig. 2, pl. III) et tapissées par de volumineuses cellules claires (*c, c* fig. 2, pl. III). Ces cellules laissent persister une petite lumière de façon à reproduire l'aspect typique d'un acinus de glande salivaire (*tu, tu* fig. 2, pl. III), ou remplissent complètement la cavité (*p, p* fig. 2, pl. III). Ces acini de nouvelle formation renferment de fréquentes karyokinèses et donnent naissance à des bourgeonnements périphériques qui constitueront des alvéoles nouveaux (*f* fig. 2, pl. III).

Disséminés dans cette prolifération adénomateuse on note des foyers mal limités d'une prolifération bronchique désordonnée qui distend et dissocie jusqu'aux dernières ramifications des bronches, pénètre le tissu l'infiltration embryonnaire péribronchique, envahit des cavités adénomateuses alvéolaires voisines et constitue un véritable épithélioma bronchique.

Mais à côté de ces adéno-épithéliomes nous avons étudié de grosses tumeurs pulmonaires qui constituent histologiquement l'épithélioma broncho-alvéolaire (pl. III, fig. 3) le plus indiscutable. Les bronches apparaissent comme d'énormes amas de cellules épithéliales atypiques désorientées et divisés en lobules par de fines travées conjonctives vascularisées à leurs carrefours et donnant, à leur périphérie, des bourgeonnements irréguliers de même structure et qui sont en continuité avec de vastes foyers de prolifération épithéliale d'origine alvéolaire. Cette dernière prolifération constitue une formation néoplasique irrégulière (*lob, lob* fig. 3, pl. III) divisée irrégulièrement par une fine trame conjonctive vascularisée (*t, t* fig. 3, pl. III). Ces espaces sont remplis de cellules atypiques, claires, volumineuses, à gros noyau chargé de chromatine, ou bien de cellules sombres et déformées (*lob* fig. 3, pl. III). Sous l'influence de la prolifération cellulaire des travées conjonctives s'effilent puis disparaissent de sorte qu'il se forme des amas épithéiaux très étendus (fig. 4, pl. III). A mesure que l'on va vers la périphérie les lobules épithéiaux deviennent plus petits, leur paroi porte, suivant les points, un nombre variable de rangées des cellules polygonales, cylindroïdes, anguleuses . . . qui laissent parfois un lumière. Tout a fait à la périphérie on observe le passage à l'adénome alvéolaire. Sur des coupes où la lésion est moins avancée il existe des amas épithéliomateux plus réduits, isolés ou qui se réunissent plus ou moins.

E. Lésions du foie.

Violacé et légèrement augmenté de volume, le foie est parsemé de placards jaunâtres ou bien il présente une teinte générale jaune du foie gras. Sur le fond congestionné ou décoloré se détache une éruption, parfois très abondante, de pustules arrondies, blanches, légèrement saillantes et dures. Elle vont du volume d'une pointe d'épingle à celui d'un grain de chenevis et même d'un petit pois; celles-ci sont plus blanches, très dures et saillantes. A la coupe, ces pustules sous capsulaires s'enfoncent dans le parenchyme lequel en présente dans son épaisseur. Dans les infections intenses, le foie présente des régions considérables jaune clair, légèrement saillantes, à limites nettes.

On note de larges pustules sur la muqueuse de la vésicule biliaire.

L'examen histologique d'une grande variété de ces lésions permet de constater des néoformations d'un grand intérêt.

a) La prolifération des canaux biliaires intrahépatiques peut donner naissance à la formation d'un adénome papilleux très développé. Les cavités de nouvelle formation bordées plusieurs rangs de cellules atypiques se distendent et ne sont plus séparées

que par de fines travées conjonctives qui émettent dans leur intérieur prolongements papillaires.

b) Nous désignons sous le nom d'adéno-hypertrophie périportale avec dégénérescence grasseuse sus hépatique, la lésion histologique qui correspond à ces régions jaune clair, parfois très étendues légèrement saillantes et bien limitées. Il existe une dégénérescence grasseuse avec nécrose pigmentaire de la partie centrale du lobule; autour de la veine porte ou note une prolifération adénomateuse qui se continue vers la veine sus hépatique par une zone d'énormes cellules sans disposition régulière apparente et qui pénètrent plus ou moins la partie dégénérée. A un faible grossissement, on a l'image par faite du foie interverti. A un fort grossissement, les formations adénomateuses qui sont au voisinage de la veine porte sont constituées par des cavités arrondies ou tubulées et bourgeonnantes, revêtues d'une ou plusieurs couches de cellules demi claires reposant sur une basale, et renferment de très nombreuses karyokinèses. Formées aux dépens des canalicules biliaires normaux ces formations s'étendent assez loin de la veine porte et constituent un adénome typique d'origine biliaire. Mais si l'on continue l'examen de la prolifération périportale en allant vers le centre du lobule on voit que les cellules épithéliales augmentent de volume, sont les unes sombres les autres claires et finissent par subir une hypertrophie colossale pour former d'énormes bourgeons au centre desquels apparaît une cavité en continuité avec les tubes adénomateux voisins. Plus loin, ces énormes cellules presque toutes claires, parsemées de quelques grandes cellules foncées, forment des amas qui finissent par s'orienter suivant une disposition tubulée très discrète; tout à fait à la périphérie, elles ont une disposition simplement pavimenteuse. Cette prolifération paraît être en rapport avec la division et l'hypertrophie des cellules hépatiques (adénome trabéculaire) et se confond, sans démarcation précise, avec la prolifération adénomateuse biliaire.

c) L'adéno-épithéliome et l'épithéliome hépatique se présentent avec une netteté parfaite dans les nodules claveleux de grand volume. On constate de larges placards dans les quels la structure du foie n'est plus reconnaissable; ils sont entourés par un tissu conjonctif embryonnaire et parcourus par de fins tractus conjonctifs qui s'épaississent en des carrefours étoilés. Ils limitent des amas formés de cellules atypiques (*a, a, a* fig. 1, pl. III) dont certaines en transformation claire présentent une hypertrophie colossale (*cl, cl* fig. 1, pl. III) et des figures fréquentes de mitose (*k* fig. 1, pl. III) et d'autres de volume variables, plus ou moins sombres et déformées. A la périphérie, ces amas donnent naissance, par bourgeonnement, à de nouvelles proliférations qui pénètrent directement dans les espaces conjonctifs. Cette néoformation peut envahir une étendue considérable; elle constitue un épithéliome trabéculaire. Si en effet, on étudie les lobules hépatiques dans les quels la transformation épithéliomateuse n'est pas totale (fig. 1, pl. III) on observe les transitions les plus nettes entre les cellules hépatiques en karyokinèse (*rio* fig. 1, pl. III) les grandes cellules sombres (*l, l* fig. 1, pl. III) et les grandes cellules claires des formations épithéliomateuses (C. R. Soc. Biol.).

d) Nous avons constaté à plusieurs reprises la disposition pavimenteuse régulière des cellules hépatiques devenues claires et hypertrophiées, avec disparition, sur de grand espaces de la disposition trabéculaire et confusion des lobules. Cet aspect est identique à celui que Roger a décrit dans la variole. Ces cellules peuvent s'orienter autour de cavités formées, semble-t-il, par de grandes cellules endothéliales dégénérées, de façon à constituer un adénome trabéculaire.

Nous ne faisons que signaler ici les lésions nodulaires conjonctives; nous les étudierons ailleurs. Disons seulement qu'elles présentent des caractères qui les rapprochent singulièrement des néoformations conjonctives syphilitiques.

F. Lésions du rein.

Dans le cas d'éruption généralisée intense, le rein présente en dehors d'une teinte congestive tachée de bandes jaunes de dégénérescence grasseuse, un semis parfois très abondant de petits nodules d'un blanc nacré du volume d'une pointe d'épingle à un grain de chenevis.

L'examen histologique de ces pustules rénales laisserait penser au premier abord qu'il ne s'agit que d'une prolifération nodulaire conjonctive. Mais si l'on étudie les grosses pustules où le processus est plus avancé l'on constate à côté de la lésion conjonctive, une lésion épithéliale qui s'étend et bientôt domine. La prolifération conjonctive débute autour des vaisseaux; de périvasculaire, elle devient intertubulaire et finit par entraîner la dégénérescence des tubes rénaux. Mais bientôt, dans cette prolifération néovasculaire avec endopérivasculite identique à celle de la syphilis, un examen attentif montre la formation de tubes épithéliaux basale à peine apparente et distendus

par d'énormes cellules claires, parfois en karyokinèse. Ces tubes donnent naissance, par bourgeonnement à de nouveaux tubes remplis de cellules atypiques et qui se compriment. Dans les pustules les mieux développées les cavités se distendent, ne sont plus séparées que par une mince cloison conjonctive, présentent une lumière bordée de cellules atypiques et constituent ainsi un adénome du rein à cellules claires.

Dans une de nos préparations les cavités étaient bordées de cellules tellement atypiques et présentaient une telle disposition que l'on pourrait admettre l'existence d'un adénoépithéliome.

G. Lésions du pancréas.

A la suite d'inoculations intrapéritonéales, le pancréas peut présenter des points d'induration qui apparaissent à la coupe comme des nodules d'un gris violacé.

A l'examen histologique, nous avons constaté: 1) un adénome papillomateux extrêmement développé des canaux excréteurs. La figure 5 est assez

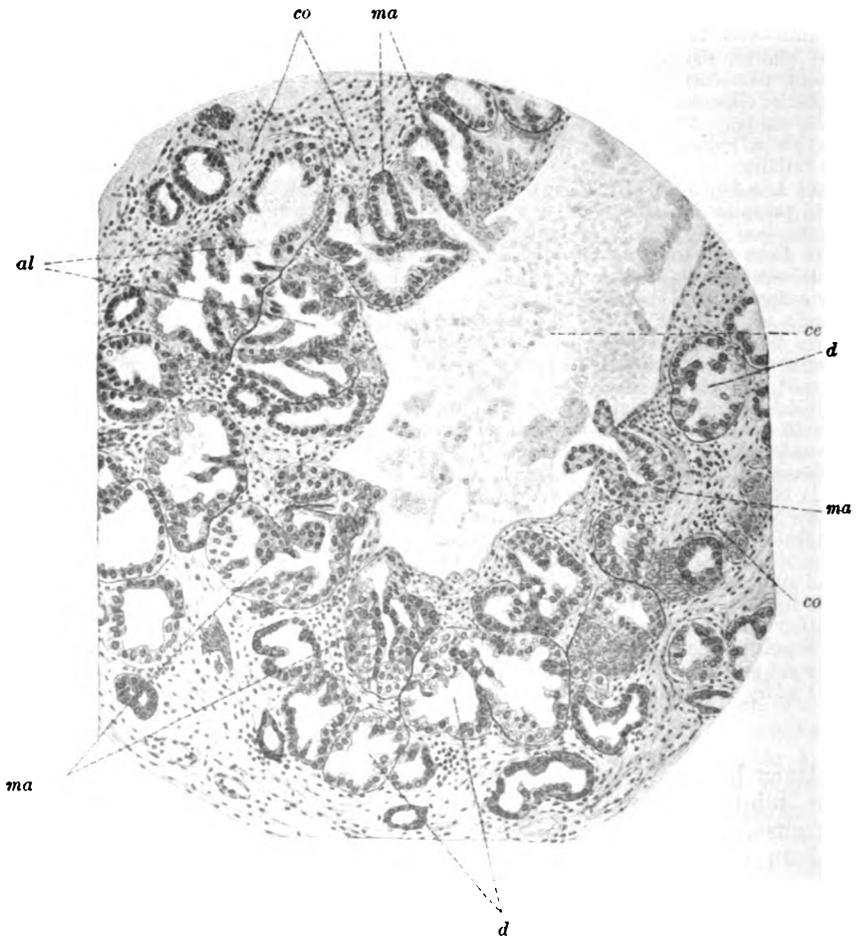


Figure 5. Adénome développé aux dépens des canaux excréteurs du pancréas (adénome-papilleux). — *co*, *co* tissu conjonctif embryonnaire; *ce* canal excréteur; *d*, *d* alvéoles dilatés à épithélium proliféré; *ma*, *ma* cavités devenues volumineuses, et d'aspect papillomateux; *al* cavités distendues, papillomateuses et séparées par mince cloison conjonctifs.

explicité pour nous dispenser de toute description. 2) un adéno-épithéliome d'origine acineuse: Les cellules des ramifications terminales des canaux excréteurs s'hypertrophient, deviennent claires et, dans les acini correspondants, certaines cellules deviennent énormes et subissent la transformation claire. Par division karyokinétique il se forme de nouveaux acini remplis de cellules atypiques sombres ou claires et qui en augmentant de volume réduisent le tissu conjonctif intermédiaire à une trame extrêmement fine et constituent une figure d'adéno-épithéliome glandulaire.

Nous avons constaté les lésions de même ordre au niveau de la glande lacrymale, de la parotide, des testicules. Nous insisterons surtout sur les lésions de la mamelle.

H. Lésions de la mamelle.

Au cours de la clavelée généralisée, la mamelle peut présenter des lésions caractérisées histologiquement par de l'adénome papillaire.

Par injection de virus claveleux dans la mamelle et dans le tissu périmammaire nous avons déterminé la formation de véritables tumeurs volumineuses de la glande mammaire (C. R. Soc. Biol. 1903).

Au début des ces tumeurs, il existe une hypertrophie diffuse de la glande et l'examen histologique montre qu'il s'agit d'un adénome acineux envahissant caractéristique.

Les tumeurs mammaires complètement développées peuvent atteindre le volume d'un gros œuf de poule; bosselées, dures, adhérentes à la peau, elles présentent une surface de section ferme, parcourue de travées conjonctives grisâtres qui limitent des lobules et des alvéoles blanchâtres ou blanc jaunâtres donnant, au centre, des comédons, envahissant le tissu celluloadipeux périphérique. L'aspect est celui de certains épithéliomas à marche rapide de la mamelle, chez la femme.

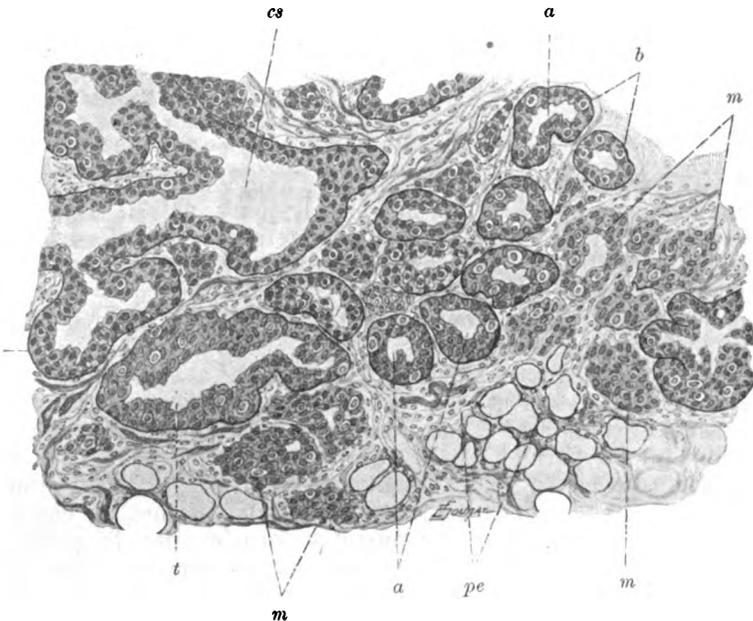


Figure 6. Adénome de la mamelle. (Zeiss obj.; ocul. 6. comp.) — *cs* conduit excréteur dilaté tapissé d'un revêtement épithélial proliféré sur plusieurs couches; *a*, *a* acini dont l'épithélium est hyperplasié; *t* acinus dilaté et dont les cellules épithéliales sont augmentées de volume et proliférées; *m*, *m* acini de nouvelle formation; *pe* tissu adipeux.

A l'examen histologique, on peut suivre toutes les phases depuis l'adénome formé aux dépens des acini glandulaires (figure 6), jusqu'à l'épithélioma typique et au carcinome. Les cellules épithéliales acineuses prolifèrent sur plusieurs couches (*a, g* fig. 6) de même quelles des canaux excréteurs (*cs* fig. 6); elles donnent naissance à des bourgeons pleins (*m, ms* fig. 6) qui donneront naissance à de nouveaux acini. Si l'on suit la prolifération cellulaire on voit que ces tubes d'adénome acineux se remplissent de cellules de plus en plus atypiques, se distendent et constituent des tubes ou des amas volumineux bourrés de cellules extrêmement atypiques, avec parfois une lumière due à la dégénérescence des cellules centrales, les cellules périphériques reposant directement sur le tissu conjonctif et bourgeonnant dans ses interstices. Il s'agit là d'un épithélioma glandulaire typique. Mais les cellules bordantes peuvent présenter une prolifération karyokinétique très active qui forme des boyaux épithéliaux; ceux-ci pénètrent les espaces conjonctifs voisins puis vont former dans un tissu conjonctif embryonnaire des colonies qui donnent naissance à des traînées, à des amas et à des lobules épithéliaux (*t, t, t* pl. II, fig. 16). Ainsi se constitue (fig. 16, pl. II) l'épithéliome atypique ou Carcinome claveleux.

En résumé, la clavelée, maladie générale virulente, septicémique (au moins passagèrement) produit dans tous les organes des lésions qui au point de vue macroscopique présentent une grande affinité avec les néoformations néoplasiques et qui, au point de vue microscopique, sont caractérisées par une prolifération épithéliale apte à constituer des édifications volumineuses, désorientées, atypiques et envahissantes.

Et ce ne sont pas seulement les épithéliums de revêtement (peau, cornée, bouche, rumen) qui réagissent ainsi devant le virus claveleux, mais encore tous les épithéliums glandulaires (poumon, foie, estomac, pancréas, glande lacrymale, mamelle...) autant ceux des canaux excréteurs que des acini. Ces proliférations désordonnées vont du papillome à l'épithélioma pavimenteux à globes épidermique pour les revêtements malpighiens; elles vont de l'adénome simple ou papilleux à l'adéno-épithéliome, à l'épithéliome typique et au carcinome pour les épithéliums glandulaires.

Il existe bien donc un épithélioma claveleux c'est à dire un épithélioma parasitaire¹⁾.

II. Le virus.

La virus claveleux est limitée tout d'abord à la lésion pustuleuse d'inoculation pendant un certain nombre de jours, puis il se produit une éruption de pustules généralisées qui sont toutes virulentes et dont la virulence est limitée à la lésion pustuleuse même. Pour expliquer l'apparition de l'éruption généralisée il faut admettre que le virus est passé dans le sang; nous avons démontré, en effet, la virulence du sang à partir de la période prééruptive (C. R. Soc. Biol. 1902. 2 févr.) et à des doses de vingt, dix, un centi-cubes et même avec 5 gouttes (Presse médicale. 1903. 14 févr.). Ce virus est toutefois en petite quantité dans le sang et celui-ci ne paraît constituer qu'un milieu de passage (Soc. Biol. 1902) qui lui permet, après une pullulation active dans la tumeur d'inoculation, d'aller se fixer au niveau d'autres surfaces épithéliales. L'affinité du virus claveleux pour les épithéliums permet de comprendre la limitation de la virulence aux pustules formées par la prolifération épithéliale et laisse penser que le virus est en rapport étroit avec la

1) Nous avons décrit, depuis mai 1901, dans des notes successives à la Société de Biologie de plus grande partie des lésions que nous indiquons ici. Au point de vue histologique ces lésions aboutissent au véritable épithélioma et si Borrel qui d'ailleurs ne nous cite même pas, dans un travail récent, n'a vu que des lésions d'épithéliose c'est que son matériel était insuffisant.

cellule proliférée. Le virus peut suivre également la voie lymphatique et nous avons démontré la virulence des ganglions hypertrophiés placés au voisinage des grosses lésions claveleuses (C. R. Soc. Biol. 1902) et non de tous les ganglions, comme nous le fait dire ridiculement Borrel.

Pour nous fixer davantage sur le siège du parasite nous avons constaté la virulence de la prolifération épithéliale à son extrême début, alors qu'il n'y a pas d'autres éléments que les cellules proliférées. En outre si l'on fait un râclage superficiel d'une pustule au quatrième jour, dure et dépourvue de lymphé, la fine émulsion cellulaire obtenue est donée d'une activité, plus considérable que la lymphé retirée de la même pustule 7 à 8 jours plus tard.

Partant de ces faits nous avons recherché et découvert dans la cellules épithéliales de la prolifération pustuleuse et dans les grandes cellules conjonctives, des inclusions intraprotoplasmiques d'une structure précise¹⁾ et tout à fait spéciale; ces inclusions existent dans toutes les pustules avec le même aspect et la même structure et elles sont mises en liberté dans la lymphé par la destruction vacuolaire des cellules. Nous les avons trouvées également dans les grands mononucléaires du sang après de patientes recherches, dans des cas de clavelée violente.

Description des inclusions. — Les inclusions siègent dans le protoplasma des cellules, jamais dans le noyau. Elles sont extrêmement nombreuses et l'on peut dire que chaque cellule de la pustule d'inoculation cutanée, par exemple, en renferme une. Ces inclusions sont d'autant plus petites que l'on examine les parties les plus périphériques, c'est à dire les plus jeunes, de la prolifération (zone de progression), et d'autant plus volumineuses que l'on examine la partie centrale et superficielle de la pustule, c'est à dire la plus ancienne.

Il existe de nombreuses formes très petites qui peuvent ne pas atteindre $\frac{1}{4}$ de μ , arrondies ou diplococciques; les plus abondantes ont de $1\ \mu\frac{1}{2}$ à $7\ \mu$ de diamètre et présentent une forme irrégulièrement arrondie, à bords ondulés, ou s'étirent en grosse virgule, en sablier, en une masse à prolongements digités. Elles ont donc un aspect amiboïde des plus nets, aussi bien à l'état frais qu'après coloration.

La structure de ces inclusions est précise: nous l'avons décrite d'abord le (Soc. Biol. 1901), puis dans notre mémoire des Archives de médecine exp. de mai 1901 enfin avec les meilleures méthodes et la plus grande netteté à la Soc. de Biol. le 2 févr. 1902. Cette structure a été mal vue par Borrel: la plupart des inclusions ayant l'aspect réticulé ou en gouttes bataviques qu'il décrit sont dues à une mauvaise fixation. Grassi (Anna Foà, R. C. dell. Accad. de Lincei. 1903) a retrouvé certains des caractères de nos inclusion.

Ce sont les râclages de la partie superficielle de la pustule cutanée au 8. jour fixés, sans dessiccation, par le Flemming, suivant notre méthode, et colorés par la safranine anilinée suivie de picroindigo-carmin, qui nous ont donné des figures non déformées avec une élection parfaite des couleurs (figures 1 à 16 de la planche II).

Les inclusions sont formées d'une partie colorée en bleu par le picro-indigo-carmin (figures 1 à 16, pl. II), en rouge orangé par l'éosine (*in, in*, fig. 1, pl. I), en rouge vineux par le van Gieson ou par le triacide en jaune par l'orange G, c'est à dire qu'elle présente une affinité spéciale pour les colorants protoplasmiques. Dans cette partie sont enfermés un ou plusieurs corps qui prennent au contraire, d'une façon élective, les colorants nucléaires: ils sont colorés en bleu violet par l'hématéine (*in, in*, pl. I, fig. 1), en noir foncé par l'hématoxyline ferrique (*in, in*, fig. 2, pl. I), en vert par le triacide, en rouge par la safranine ou le rouge de Magenta (fig. 1 à 16, pl. II), en bleu par la thionine. Aussi donnerons nous le nom de masse protoplasmique à la masse de l'inclusion et le nom de corps nucléaire au corps chromatique qu'elle renferme.

1) Il est curieux de voir Borrel (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1903. 25 févr.) décrire nos inclusions sans même nous citer ou en laissant croire que nous n'avons vu ces inclusions que dans le sang, et encore parle-t-il du «peu de précisions» des descriptions. Ces figures reproduites dans ce mémoire sont cependant elles qui, avec les préparations correspondantes, ont été montrées le 2 févr. 1902 à la Soc. de Biol. et Borrel s'est bien gardé à ce moment, de dire qu'elles n'étaient pas précises.

Les inclusions les plus petites sont formées par une fine granulation nucléaire colorées en rouge vif par la safranine et entourées à peine visibles puis par des granulations par une mince couche protoplasmique, à peine visible, coloré en bleu par le micro-indigo-carmin. Les inclusions de 2 à 5 μ sont constituées par une masse protoplasmique de plus en plus étendue qui renferme un corps nucléaire de 1 à 2 μ de diamètre, parfois clair dans sa partie centrale (*a*, fig. 1, pl. II). Dans les inclusions de 5 à 8 μ le protoplasma homogène peut renfermer un corps nucléaire de 2, 3 et 4 μ de diamètre formé par une membrane périphérique réunie à une granulation centrale par des rayons plus ou moins nombreux, de sorte qu'il ressemble au noyau de la cellule hépatique à réseau chromatique rayonné (*b*, fig. 2, pl. II; *a*, fig. 7, pl. II).

Lorsqu'on examine des inclusions de grande taille, l'on constate qu'elles peuvent renfermer un corps nucléaire étoilé (*m*, fig. 8, pl. II) qui prend un aspect de division karyokinétique (*d*, fig. 8, pl. II) et dont nous avons trouvé depuis des formes absolument typiques ou bien dont la chromatine s'étire en filaments ondulés qui rayonnent du centre (*a*, fig. 10, pl. II) ou se déploient en filament moniliforme (*c*, fig. 11 et *t*, fig. 12, pl. II). Ce filament se fragmente de plus en plus (*d*, fig. 13, pl. II) et aboutit à la formation de fines granulations rondes qui se portent à la périphérie (*s*, fig. 14, pl. II). À côté des formes à masse protoplasmique homogène il en existe dont le protoplasma devient de plus en plus finement granuleux à la périphérie; le corps nucléaire se divise dans la partie centrale homogène (fig. 3, pl. II), puis, celle-ci diminuant de plus en plus (masse résiduelle), les divisions nucléaires passent dans la partie granuleuse (fig. 4, pl. II). Cette partie granuleuse se condense autour de chaque grain nucléaire (*r*, fig. 5 et *r*, fig. 6, pl. II) et il se forme un nombre variable de petits corpuscules nucléés entourés d'un fin anneau de protoplasma (*ch*, fig. 6, pl. II); ou bien les grains chromatiques se divisent jusqu'à former des granulations extrêmement fines qui se portent à la périphérie et sont même saillie à l'extérieur. La division devient tellement fine que les granulations sont à peine visibles avec les plus forts grossissements (*r*, fig. 5, pl. II). Nous considérons ces fines granulations en poussière, comme de véritables chromatozoïtes. Parmi les inclusions à protoplasma homogène il faut en signaler dans lesquelles le noyau se fragmente sous forme de granulations volumineuse, arrondies, périphériques, peu nombreuses (*gr*, *gr*, fig. 15, pl. II) et une grande précision de structure.

En rapprochant toutes ces figures on peut les classer suivant des séries qui présentent tous les intermédiaires et qui ne sont pas sans rapport avec des cycles évolutifs, ainsi que nos figures permettent d'en juger:

1. type: reproduction par division du noyau le noyau se divise dans une masse protoplasmique qui se différencie puis se divise à son tour pour se concentrer autour de chaque division nucléaire (pl. II, fig. 1 à 6) ou aboutir à des grains invisibles (chromatozoïtes).

2. type: reproduction karyokinétique: division mitotique du noyau, dans une masse protoplasmique homogène, aboutissant à une fragmentation chromatique fine (pl. II, fig. 7 à 14) [chromatozoïtes].

3. type: reproduction par étirement: les inclusions de très petite taille s'étirent, prennent une forme diplococcique et se séparent. (Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Helminthologische Beobachtungen.

Von Dr. v. Linstow in Göttingen.

Mit 7 Figuren.

Die Gelegenheit, die hier beschriebenen Helminthen untersuchen zu können, verdanke ich Herrn Dr. Shipley in Cambridge, dem ich an dieser Stelle nochmals meinen besten Dank ausspreche.

Ankylostomum americanum Stiles. aus *Limia troglodytes* Blumenb. Darm.

An dem nach der Rückseite gekrümmten Kopfende steht ein großer Mundbecher, der vorn von breiten Rippen gestützt ist; am Grunde stehen 5 kegelförmige Vorragungen; hakige Zähne an der Mündung des Mundbeckers, wie man sie bei *Ankylostomum duodenale*

findet, fehlen hier. Die Cuticula ist quergeringelt. Der Oesophagus, welcher beim Männchen $\frac{1}{8,6}$, beim Weibchen $\frac{1}{1,1}$ der Gesamtlänge einnimmt, ist erheblich schmaler als der Darm; der Porus excretorius liegt unter seiner Mitte. Das Männchen ist 6,78 mm lang und 0,31 mm breit; die schmalen Cirren messen 1,36 mm; die Seitenlappen der Bursa sind von je 6 Rippen gestützt, die 2. ist doppelt und die 3.—6. entspringen von gemeinsamer Basis; der unpaare Mittellappen zeigt jederseits 2 Rippen und die beiden äußeren Aeste sind nochmals gespalten, so daß man 6 Endäste zählt. Das Weibchen hat eine Länge von 9,9 mm und eine Breite von 0,35 mm; der kegelförmige Schwanz nimmt $\frac{1}{4,5}$ der ganzen Länge ein; die Vagina liegt hinter der Mitte und teilt den Körper im Verhältnis von 4:5; die Windungen des Uterus und der Ovarien erfüllen den Körper dicht; die Eier sind 0,065 mm lang und 0,046 mm breit.

Stiles¹⁾ beschrieb diesen Nematoden unter dem Namen *Uncinaria americana* und sagt von ihm, er bewohne massenhaft den Darm des Menschen im Südosten von Nordamerika, in dem Dreieck Virginia-Galveston-Portorico; die ganze arme Bevölkerung ist von ihm befallen, und er spielt hier eine noch verderblichere Rolle als *Ankylostomum duodenale* bei den Gruben-, Tunnel- und Ziegelarbeitern in Europa und Afrika. Bei den Kindern in Amerika wird die körperliche und geistige Entwicklung durch den Parasiten gehemmt; Patienten von 20—23 Jahren gleichen durch die Toxinwirkung 11—16-jährigen Kindern; die Anämie, welche er hervorruft, wurde früher der Malaria zur Last gelegt. Ich fand ihn als Parasiten des westafrikanischen Schimpansen; dort wird er in den Menschen geraten sein, der ihn dann auf Verkehrswegen nach Nordamerika brachte, wo er sich weit ausgebreitet hat und eine höchst verderbliche Rolle spielt.

Mermis mirabilis n. sp.

Fig. 1—4.

Von den Wainae-mountains in Oahu, Hawaii-Inseln.

Der Körper ist farblos und sehr zart; vermutlich sind die Tiere im Süßwasser gefunden. Die Cuticula ist sehr dick; am Kopfende ist das Parenchym knopfförmig verdickt und hier stehen im Kreise 6 Papillen, in der Scheitelgegend aber zwei nach vorn gerichtete Zapfen wie bei *Mermis nigrescens*; 0,29 mm vom Kopfende beginnt eine Ventraldrüse, die dicht vor ihm in einen Porus excretorius mündet. Von den 6 Längswülsten sind die beiden Dorsolateral- und der Ventralwulst stark entwickelt und mit Kernen versehen, während die Ventrolateral- und der Dorsalwulst schwach und kernlos sind; sie grenzen 6 Felder ab, welche folgende prozentische Ausdehnung haben:

Dorsal-,	Lateral-,	Ventral-,	Ventral-,	Lateral-,	Dorsalfeld
21	16	13	13	16	21

Es sind 2 Exemplare vorhanden, ein 85 mm langes und 0,35 mm breites Weibchen; das andere 43 mm lange und 0,21 mm breite Exemplar ist der merkwürdigste Nematode, den ich je gesehen habe, denn er ist ein Hermaphrodit, der vorn Weibchen und hinten Männchen ist; hinter der Mitte sieht man die weibliche und am Schwanzende die männliche

1, Stiles, C. W., Hook-worm disease in the South. Frequency of infection by the parasite (*Uncinaria americana*) in rural districts. (Public health report. 1902. No. 43. p. 2433—2434.) — A new species of hookworm (*Uncinaria americana*) parasitic in man. (American medicine. Vol. III. 1902. No. 19. p. 777—778.)

Geschlechtsöffnung. Der Uterus nimmt fast $\frac{3}{4}$ der ganzen Länge ein; teilt man die Tierlänge in 100 gleiche Teile, so kommen vorn 23 ohne Uterus, hierauf 72 vom Uterus ausgefüllte und dann 5 Teile ohne denselben; ebenso ist die Lage bei dem größeren, rein weiblichen Exemplar;

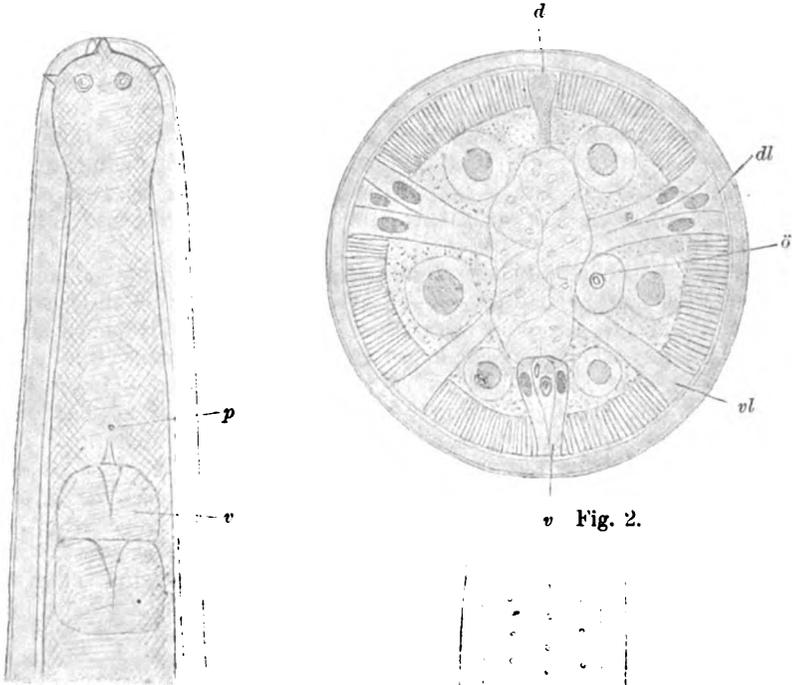


Fig. 1.

v Fig. 2.



Fig. 4.

Fig. 3.

Fig. 1—4. *Mermis mirabilis*. 1 Kopfende, *v* Ventraldrüse, *p* Porus excretorius; 2 Querschnitt ganz vorn, *d* Dorsal-, *v* Ventral-, *dl* Dorsolateral-, *vl* Ventrolateralwulst, *ö* Oesophagusrohr; 3 Schwanzende des hermaphroditischen Exemplars mit Geschlechtsöffnung, Cirren und 3 Papillenreihen; 4 ein Ei.

die Vagina mündet bei beiden Exemplaren genau unter der Mitte des Uterus und tritt nach kurzem Verlauf an denselben; die Vulva ist bei beiden Exemplaren zum Zeichen der Befruchtung mit einem braunen Kitt überdeckt; sie teilt den Körper im Verhältnis von 34 : 31. Die Eier beider Tiere sind sehr charakteristisch; sie sind 0,061 mm lang und 0,039 mm breit; die innere Schale ist kugelförmig und enthält den aus-

gebildeten Embryo, die äußere aber ist an den beiden Polen verschmälert und in der Mitte aufgetrieben, wie bei keiner anderen *Mermis*-Art. Das Hinterleibsende beider Exemplare ist abgerundet, bei dem kleineren, dem hermaphroditischen, sieht man 0,22 mm Schwanzende die männliche Geschlechtsöffnung, was einer Schwanzlänge von $\frac{1}{106}$ entspricht; vor ihr liegen zwei gleiche, 0,12 mm lange, schwach gekrümmte Cirren mit abgerundetem Hinterende; an der Bauchseite verlaufen 3 Papillenreihen bis ans Schwanzende, eine mediane und zwei seitliche, die aus je etwa 12—15 Papillen bestehen; in der mittleren stehen dicht hinter der Geschlechtsöffnung 2 Papillen nebeneinander.

Mermis nigra n. sp.

Fig. 5—6.

aus Zomba am Nyassa-See, Südafrika. Cameron leg.

Eine Larvenform, 3 Exemplare, von denen zwei kohlschwarz sind und eine dunkelbraun ist; die Größenverhältnisse sind folgende:

Länge	200 mm	Breite	0,35 mm
"	170	"	0,31
"	44	"	0,25

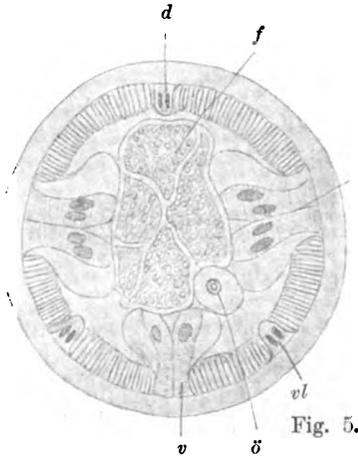


Fig. 5.

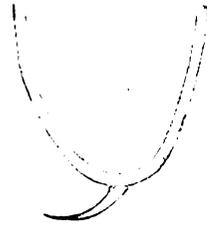


Fig. 6.

Fig. 5—6. *Mermis nigra*. 5 Querschnitt ganz vorn, Bezeichnung wie in Fig. 2 *f* Fettkörper; 6 Schwanzende mit Horn.

Das Kopfende ist gerade abgestutzt, das abgerundete Schwanzende trägt bei den beiden größeren Exemplaren ein kleines Horn; das kleinste befindet sich in Häutung. Die Verhältnisse der Längsfelder sind denen von *Mermis mirabilis* entsprechend, auch die verhältnismäßige Größe der 6 Längsfelder ist genau dieselbe; die Form der Längswülste aber ist eine andere, wie sich aus den Abbildungen ergibt.

Mermis nigrescens Duj.

Ein neues Wohntier der Larve ist *Forficula acanthopygia* Géné.

Mermis albicans v. Sieb.

Die Larve dieser Art lebt auch in der Raupe von *Agrotis orbona* Hfn.
= *Triphaena subsequa* Tr.

Das Genus

Mermis

gehört zu den Pleuromyariern, d. h. in den Seitenlinien stehen Muskeln; ganz vorn und ganz hinten im Körper sind, wie ich¹⁾ gezeigt habe, die 6 Seitenwülste so zusammengedrängt, daß die Dorsolateralwülste mit ihrem Rande die Laterallinien bedecken; in der Mitte des Körpers, wo die Längswülste relativ viel schmaler werden, findet sich Muskulatur in den Seitenlinien; die Mitte der Dorsolateralwülste liegt immer, bald mehr, bald weniger, dorsal von der Laterallinie; der Porus excretorius ist hier die Oeffnung einer Ventraldrüse; die Längswülste sind ohne Gefäße. Neuerdings sind 3 andere, mit *Mermis* nahe verwandte Genera aufgestellt:

Paramermis v. Linstow¹⁾.

Von *Mermis* durch ein einfaches Spiculum des Männchens unterschieden, deren *Mermis* zwei hat; bei beiden Gattungen stehen am männlichen Schwanzende ventral 3 Papillenreihen, die ganz oder zum Teil verdoppelt sein können.

Hydromermis Corti²⁾.

8 Längsfelder, die 8 Muskelfelder abgrenzen, die beiden Seitenfelder sehr breit, Cuticula ohne gekreuzte Fasernsysteme, Männchen mit einem Spiculum.

Pseudomermis Zykoff³⁾.

Cuticula ohne gekreuzte Fasernsysteme, Männchen nicht beobachtet.

Gyrocotyle Medusarum n. sp.
aus *Phyllorhiza? rosea* Pér. et Les.

Eine Larvenform, die in 3 Exemplaren vorhanden ist, welche folgende Größenverhältnisse zeigen:

Länge 15 mm, Breite 6 mm

"	11,5	"	"	4	"
"	7,5	"	"	3,3	"

Der Körper ist Ligula-artig abgeplattet und die Dicke verhält sich zur Breite wie 1 : 6; vorn ist der Körper verschmälert, hinten abgerundet und verdickt; die Cuticula zeigt Querringel und unregelmäßige Längsrinnen. Geschlechtsorgane fehlen noch ganz; Kalkkörperchen sind nicht vorhanden. Die Cuticula ist 0,039 mm dick, aus senkrecht zur Oberfläche gestellten Fasern gebildet; dicht unter ihrer Oberfläche liegt eine Schicht Pigmentkörner; der Hauptlängsnerv liegt $\frac{7}{100}$, das Hauptlängsgefäß $\frac{16}{100}$ des Querdurchmessers vom Rande entfernt; bei *Gyrocotyle rugosa* verlaufen die beiden Hauptlängsnerven im 2. und 4. Fünftel des Querdurchmessers. Unter der Cuticula liegt eine dünne Lage Ring-, darunter eine solche Längs- und unter dieser eine breite Ringmuskelschicht; unter den Parenchymmuskeln sind die dorsoventralen die stärk-



Fig. 7.

Fig. 7. *Gyrocotyle Medusarum* in natürlicher Größe.

1) v. Linstow, Das Genus *Mermis*. (Arch. f. mikroskop. Anat. Bd. LIII. Bonn 1898. p. 149—168. Tab. III.)

2) Corti, Rendiconti Istit. Lombard. sc. e lettr. Ser. II. Vol. XXXV. Milano 1902. p. 1—9.

3) Zykoff, Materialien zur Wolgafauna und Wasserfauna des Saratowschen Gouvernements. Moskau 1902. p. 61—64. Tab. I.

sten. Vom Genus *Gyrocotyle* kennt man außerdem 2 Geschlechts- und eine Larvenform:

Gyrocotyle amphiptyches Wagener.

= *Amphiptyches urna* Grube und Wagener, von Lönnberg¹⁾ eingehend beschrieben, aus *Chimaera monstrosa* und *Callorhynchus antarcticus*.

Gyrocotyle rugosa Dies.

aus *Ovis aries* und *Antilope pygarga* in Südost-Afrika und

Gyrocotyle spec.? Diesing,
eine Larve aus *Macra edulis*.

Nachdruck verboten.

Kurze Erwiderung auf Herrn Dr. Looss' Mitteilung: Weiteres über die Einwanderung der Ankylostomen von der Haut aus.

Von Gino Pieri, Institut der vergl. Anatomie, Rom.

(Uebersetzt von M. K. ohne Verantwortung des Verfassers.)

Der Leser wird mir dankbar sein, wenn ich in dieser meiner Antwort die von Dr. A. Looss²⁾ gegen meinen Lehrer, Prof. Grassi und mich erhobenen persönlichen Angriffe mit Stillschweigen übergehe, wenn ich auch nicht umhin kann, dieselben höchlichst zu beklagen, da ich einzig und allein von der leidenschaftslosen Forschung nach Wahrheit geleitet werde.

Looss macht es mir zum Vorwurf, seinen Namen stets mit einem anstatt mit zwei s geschrieben zu haben, aber wie leicht es vorkommen kann, in ähnliche Nachlässigkeitsfehler zu fallen, wenn man Zitate oder Eigennamen fremder Sprachen zitiert, beweist Looss selbst an verschiedenen Stellen seiner Kritik, so z. B. wenn er (p. 336) Francesco anstatt Francesco schreibt.

Ich gebe zu, übersetzt zu haben; „die Larven dringen selten in die Drüsenkanäle ein“, während Looss³⁾ behauptet, nicht in einem einzigen Drüsenkanal eine Larve gefunden zu haben, woran jedoch nur meine mangelhafte Kenntnis der deutschen Sprache schuld ist und was für die von uns besprochene Frage keinerlei Wert hat. Und was müßte ich dann wohl von Looss sagen, wenn er sich erkühnt, auszusagen: Grassi hat kürzlich durch seinen Schüler Pieri meine Behauptung⁴⁾ für falsch erklären lassen, während ich, bei der Gegenüberstellung meiner und der unvollständigen Experimente Looss' mich wohl gehütet hatte, meinen Schlußfolgerungen einen absoluten Wert zuzuschreiben und nur geschrieben hatte⁵⁾:

1) Lönnberg, K. Svensk. Akad. Handling. Bd. XXIV. Stockholm 1891. No. 6. p. 9—47. Tab. III. Fig. 34—47.

2) Looss, A., Weiteres über die Einwanderung der Ankylostomen von der Haut aus. (Centralbl. für Bakteriologie etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. 1903. p. 330—343.)

3) Looss, A., Ueber das Eindringen der Ankylostomen in die menschliche Haut. (Ib. Bd. XXIX. No. 16. p. 1737.)

4) Ib. Bd. XXXIII. p. 330.

5) Rendic. Accademia dei Lincei. Vol. XI. 1^o sem. Fasc. 5. p. 220: Credo che

„Ich glaube, daß diese meine ersten Beobachtungen mich zu der Schlußfolgerung berechtigen, daß die Hypothese von Looss in betreff einer möglichen *Ankylostoma*-Infektion durch aktives Eindringen der Larven von der Haut aus einer sicheren wissenschaftlichen Grundlage entbehrt, es bliebe somit festgestellt, daß der einzige von den *Ankylostoma*-Larven eingeschlagene Infektionsweg durch den Mund führt, wie dies zuerst von Grassi zusammen mit Parona angenommen wurde¹⁾.

Es bleibt noch ein Punkt aufzuklären, um meiner Behauptung eine vollständige Beweisführung zu verleihen und zwar das Schicksal der von der Haut aus eingedrungenen Larven; diesen wichtigen Umstand zu erklären, werde ich weitere Nachforschungen anstellen. (Die hier gesperrt gedruckten Worte sind im Original in ungesperrter Schrift wiedergegeben.)“

Jedermann, der diese Worte liest, wird sich leicht überzeugen, daß ich nur meine Meinung ausgesprochen und ein definitives Urteil mir erst nach weiteren Nachforschungen — die ich leider wegen Mangels an Material bis jetzt nicht habe vollenden können — vorbehalten hatte.

Trotz der gegen meine Versuche von Looss aufgestellten Kritiken kann ich nicht umhin, die von mir in meiner Mitteilung gegebene Interpretation für die vernünftigste zu halten. Jedenfalls bleibt die Tatsache bestehen, daß Tausende auf die Haut des Prof. Grassi und des Dr. Noè deponierte Laven keine Infektion herbeigeführt haben. Der Versuch mit Herrn Prof. Grassi wurde fast in denselben Verhältnissen vollführt, wie Looss sich infiziert hat und seiner Angabe nach seinen Versuch am Menschen ausgeführt hat, und zwar durch das Fallenlassen dicker, eine sehr große Anzahl von Larven enthaltender Wassertropfen auf die Haut und folgendes Ausbreiten derselben; vielleicht wurde in dem Versuche mit Prof. Grassi das Wasser mehr ausgebreitet als wie in den Loossschen Versuchen (und darauf ist wahrscheinlicher Weise das Nichteintreten der Reizerscheinungen zurückzuführen), aber dies verringert den demonstrativen Wert unseres Experimentes durchaus nicht.

An Noè und mir wurde das Experiment in der Art angestellt, daß der Teil der Haut, auf welchem wir das Wasser trocknen ließen, ver-

queste mie prime osservazioni mi autorizzino a concludere che l'ipotesi del Looss della possibile infezione die Anchilostoma per immigrazione attiva delle larve attraverso la pelle è priva di un serio fondamento scientifico, rimarrebbe perciò stabilito che l'unica via di infezione seguita dalle larve dell' Anchilostoma è la via orale, come per il primo constatò il Grassi insieme col Parona. Resta ancora un punto da chiarirsi per dare alla mia affermazione una dimostrazione completa: il destino delle larve penetrate attraverso la pelle. A rischiarare questa importante circostanza io dirigerò mie ulteriori ricerche.

1) Ich möchte hier die Worte Grassis und Paronas, die sich nicht in meiner Mitteilung finden, zitieren: „Aus diesen Studien resultieren ziemlich wahrscheinlich folgende Infektionsweisen: Die Eier entwickeln sich in den Faeces in Larven oder (durch Wasser aus diesen transportiert) im Kot und auf dem bewässerten Erdboden. Folglich können die Larven entweder direkt — durch Essen wenig oder gar nicht gekochter Gemüse, oder durch Berühren des Mundes mit durch Kot beschmutzten Händen, wie dies leicht bei Bäckern, Kindern u. s. w. geschehen kann — oder indirekt durch Trinkwasser, welches vor kurzem über Faeces, Kot oder Larven beherbergende Gemüse gelaufen, in den menschlichen Körper gelangen. Diese Beobachtungen erklären uns den Einfluß einiger prädisponierender (predisponenti) Ursachen, z. B. des Bodens, Klimas, Standes u. s. w. und geben uns auch Aufschluß über die Epidemien, welche vorkommen, wenn viele der Entwicklung zahlreicher Eier günstige Umstände zusammenfallen. Grassi, B., Parona, E. und Parona, C., *Intorno all' Anchilostomasi*, Milano 1879, p. 8, 9.

mittelst eines ringsum verklebten Uhrgläschens geschützt wurde, und zwar geschah dies, um soviel wie nur irgend möglich die Eventualität einer konsekutiven unfreiwilligen Infektion zu vermeiden.

Nach Looss hätten wir alle von Tausenden von Ankylostomen infiziert werden müssen, dagegen infizierten sich weder Prof. Grassi noch Dr. Noè; wenn Looss meine von ihm erwähnte Mitteilung in den Archives Italiennes de Biologie¹⁾ hätte einsehen können, würde er gelesen haben, daß bis zum 12. Juni 1902 (an welchem Tage ich besagte Mitteilung einsandte) die Untersuchung unserer Faeces stets ein negatives Resultat ergeben hatte, d. h. keine *Ankylostoma*-Eier vorgefunden wurden. Gegenwärtig bietet Noè eine sehr leichte *Ankylostoma*-Infektion dar, doch muß ich hier bemerken, daß derselbe fortgefahren hatte, an meinem Arbeitstische zu arbeiten, wo es nicht leicht war, genügende Vorsichtsmaßregeln anzuwenden (es ist sogar passiert, daß eine ganze Larvenkultur auf dem Tische umfiel und daselbst trocknete) und daß er nach dem Datum der negativen Untersuchung der Faeces sich in eine Stadt begab und längere Zeit verblieb, wo die Ankylostomen heimisch sind.

Ich infizierte mich mit 7 Ankylostomen, und diese Infektion schreibe ich — wie ich dies in meiner Mitteilung erkläre — dem zufälligen Eindringen der Larven durch den Mund zu. Um für alle Fälle die Möglichkeit eines gewissen Grades der Immunität meinerseits auszuschließen, verschluckte ich, nachdem ich mich durch wiederholte Untersuchungen meiner Faeces überzeugt hatte, keine Ankylostomen mehr zu beherbergen, ungefähr 40 *Ankylostoma*-Larven; nach 30 Tagen erschienen die ersten Eier. Durch eine Thymolkur befreite ich mich von 42 Ankylostomen, doch offenbart das beständige Vorkommen einer, wenn auch sehr geringen Anzahl von Eiern in meinen Faeces (ungefähr ein Ei für zwei oder drei Präparate von der Dimension der gewöhnlichen Deckgläschen) die Gegenwart einer kleinen Zahl von Ankylostomen in meinem Darm.

Ich muß hier hinzufügen, daß weder in Noè noch in mir sich von dem Tage der versuchten Infektion an bis auf heute auch nur das geringste Sympton von Anämie noch irgend einer anderen auf die Ankylostomen zurückführbaren Störung gezeigt hat.

Die von mir in meinen Untersuchungen angewandten Larven stammten von Ankylostomen her, die von einem in Amerika (Brasilien) infizierten Individuum beherbergt wurden. Die 7 von mir nach der ersten Infektion ausgeschiedenen Ankylostomen gehörten jenem Typus an, den Stiles kürzlich als eine neue, Amerika eigene Art (*Uncinaria americana*)²⁾ beschrieben hat; die von mir nach der zweiten Infektion eliminierten Ankylostomen hatten dagegen die Kennzeichen des *Ankylostoma duodenale*.

Was nun die von Looss verneinte Austrocknungswiderstandsfähigkeit der Larven anbelangt, so wurde dieselbe schon vor mir auch von Perroncito³⁾ bestätigt, und bestehe ich daher auf meiner durch Experimente begründeten Behauptung. Ich tröpfelte Larven enthaltendes Wasser auf verschiedene Deckgläschen und ließ es dann in freier Luft trocknen —

1) Archives Italiennes de Biologie. T. XXXVII. 1902. Fasc. 2.

2) Stiles, E. W., A new species of hockworm (*Uncinaria americana*) parasitic in man. (American Medicine. Vol. III. p. 777—778.)

3) Perroncito, Edoardo, Osservazioni elmintologiche relative alla malattia sviluppatasi endemica negli aperi del Gottardo. Roma 1880. — I parassiti dell' uomo e degli animali utili e le più comuni malattie da essi prodotte. Milano 1901. p. 455.

dies ist der fast absolute Trockenheitszustand, von welchem ich in meiner Mitteilung spreche. — In den folgenden Tagen (ich benutzte in den einzelnen Untersuchungen stets verschiedene Gläschen) tröpfelte ich reines Wasser auf die getrockneten Larven und sah nach einigen Stunden eine gewisse Anzahl derselben ihr normales Aussehen annehmen und ihre charakteristischen aktiven Bewegungen ausführen. Die Zahl der Larven, welche so zum Leben zurückkehrten, verminderte sich progressiv bis zum 7. Tage; mit den seit 8 Tagen getrockneten Larven blieb das Resultat negativ. Nicht zu vernachlässigende Faktoren bei diesen Erscheinungen sind wahrscheinlicherweise die Temperatur — die in der Jahreszeit, in welcher ich meine Untersuchungen anstellte (Dezember), ziemlich niedrig war — und die Feuchtigkeit der Umgebung (Kammer), in welcher ich arbeitete.

Obige absolut positiven Untersuchungen, wie auch diejenigen von Perroncito, können meiner Ansicht nach nicht durch die negativen Untersuchungen Looss' zu nichte gemacht werden.

Looss bringt zur Stütze seiner Meinung, d. h. der Möglichkeit der Infektion von der Haut aus, noch drei andere Experimente, eins mit einem Menschen und zwei mit Hunden. Es ist nicht möglich, über den Wert dieser Experimente zu diskutieren, da der Verfasser nicht ausführlich die Daten angegeben, welche notwendig sind, die genauen Bedingungen, in welchen dieselben stattgefunden, klarzulegen und jeden Zweifel an eine Infektion per os auszuschließen. Ich kann jedoch nicht umhin, zu bemerken, daß das Individuum, mit welchem Looss experimentierte, früher von *Anguillula intestinalis*, welche, wie bekannt, eine der der *Ankylostoma* sehr ähnliche Verteilung aufweist, infiziert war ¹⁾.

Auch ist der Zustand des Individuums, mit welchem Looss sein Experiment angestellt hat, kein zu vernachlässigender Umstand; wissen wir doch alle — und Looss gewiß besser als ich — wie unsicher es ist, derartige delikate Experimente mit ungebildeten Personen anzustellen, da uns dieselben oft täuschen, ohne es zu wollen und zu wissen. Diese Betrachtung war es, welche uns bestimmte, das Experiment an uns selbst anzustellen.

Looss hebt hervor, daß die von der Haut aus stattgefundene Infektion sich in seiner Versuchsperson nach 71 Tagen (die Entwicklungsperiode der Ankylostomen beträgt bei der Infektion durch den Mund 4—5 Wochen) bewahrheitet hat und legt dem Faktum, daß dieser Zeitraum mit jenem (4. Dezember 1901 bis 13. Februar 1902), nach welchem ich in mir die Eier der ersten Infektion bemerkte, übereinstimmt, besondere Wichtigkeit bei. Ich kann hier jedoch nicht umhin, ihm wissen zu lassen, daß ich die tägliche Untersuchung meiner Faeces bereits von der 6. Woche nach dem Experiment aufgegeben hatte und nur aus Zufall dieselben am 13. Februar einer neuen Untersuchung unterwarf ²⁾.

Die Infektion des Hundes fand dagegen fast rascher als die durch den Mund statt; mir scheint es nicht annehmbar, diese Kürze — wie

1) Inbetreff der Genauigkeit der Uebersetzung muß ich hier einschalten, daß Looss irrt, wenn er mich p. 331 sagen läßt, die Ankylostomen seien in der Stadt Cairo endemisch; ich hatte dies für das ganze Land, in welchem sich Looss befindet, gemeint, und verstand unter dem Worte natürlicherweise nicht nur die Stadt Cairo, sondern auch die umliegenden Regionen.

2) Id. Bd. XXXIII. 1903. No. 5. p. 338.

dies Looss tut — dadurch zu erklären, daß die Larven anstatt auf das Gelenk, hinter das Schulterblatt appliziert wurden¹⁾.

Meinerseits glaube ich, daß die definitive Lösung des Problems nur dann gegeben werden kann, wenn wir das Schicksal der Larven nach dem Eindringen der Haare in die Follikel bis zu ihrem Erscheinen in der Darmwand verfolgt haben werden, was ich binnen kurzem zu tun hoffe.

Rom, den 20. März 1903.

Nachdruck verboten.

Die Abschwächung der Säugetiertuberkulosebacillen im Kaltblüterorganismus.

[Aus der Untersuchungsstation des k. Garnisonlazarettes Würzburg.
Stabsarzt und Privatdozent Dr. Dieudonné.]

Von Dr. H. Herzog, k. bayr. Assistenzarzt.

Mit 1 Tafel.

Nach den Untersuchungen von de Pasquale (1) und de Michele (2) galten die Kaltblüter als immun gegen die Tuberkulose: „Die Tuberkelpilze sind noch nach langer Zeit im Organismus dieser Tiere — gleichgültig bei welcher Temperatur sie gehalten werden — nachzuweisen, Verlust an Virulenz für Warmblüter, oder sonstige Veränderungen der Pilze treten nicht ein.“ Die Veröffentlichungen von Bataillon, Dubard und Terre (3) traten in direkten Gegensatz zu diesen Anschauungen und riefen nun eine Reihe von Untersuchungen dieser, für die Biologie des Tuberkelbacillus hochwichtigen Frage, und damit nicht unbedeutende Kontroversen hervor: Die Autoren hatten aus einem sehr riesenzellenreichen Tumor an der Bauchwand eines Karpfen einen Mikroorganismus gezüchtet, der nach Gestalt, sowie tinktoriellm Verhalten mit dem Tuberkelbacillus identisch erschien, jedoch andererseits fundamentale Abweichungen von dem Erreger der Säugetiertuberkulose bot: Wachstumsoptimum bei 23—25°, innerhalb 3—4 Tagen Entwicklung eines reichlichen, flockigen Bodensatzes in Bouillon, Bildung eines seifigen, weißlichen, brüchigen Belages auf Kartoffeln. Den Beweis, daß es sich hierbei um einen an den Kaltblüterorganismus angepaßten Tuberkelbacillus handle, suchten sie dadurch zu erbringen, daß sie Karpfen mit tuberkulösen Organen von Meerschweinchen fütterten. Bereits nach 11-tägigem Verweilen im Kaltblüter sollen diese Tuberkelbacillen so abgeschwächt worden sein, daß sie für Warmblüter nicht mehr infektiös-tüchtig waren, und sich bei gewöhnlicher Temperatur züchten ließen. Wurden Kaltblüter mit Kulturen menschlicher Tuberkelbacillen infiziert,

1) Id. Bei der speziellen Lage der gewählten Infektionsstelle ist dies in der Tat unschwer möglich, da sie nur die Körperwand in gerader Richtung zu durchsetzen brauchen, um sich bereits in der Brust- oder Bauchhöhle zu befinden, von wo aus sie ohne die mindeste Schwierigkeit nach dem Oesophagus oder dem Darne gelangen können. (p. 34.)

Hiermit verliert der anfangs etwas überraschende Unterschied, der sich in dem Versuche am Menschen und dem am Hunde in Bezug auf die Inkubationsdauer der Krankheit ergeben hatte, sein Auffälliges vollkommen; er zeigt nur, daß die Larven nicht von jeder Stelle der Haut aus gleich schnell nach dem Darne zu gelangen vermögen.

so bildete sich ein sehr starker Ascites aus, und in den Leukocyten waren massenhaft Bacillen eingeschlossen. Am 12. Tage zeigten sich bei dem größten Teile der Tiere Granulationen, welche sich in nichts von denen der Säugetiere unterscheiden.

Bei weiteren Versuchen von Bataillon und Terre (4), den Säugetiertuberkelbacillus nach Passage durch Kaltblüter auf Warmblüter zu übertragen, erschien derselbe pathogen für das Meerschweinchen. Doch erwiesen sich die Bacillen insofern umgewandelt, als sie bei niedriger und höherer Temperatur (bis 47°) lebhaftes Wachstum zeigten. Dubard (5) gelangte nach seinen Versuchen zu dem Resultate, daß der Säugetiertuberkelbacillus durch den Kaltblüterorganismus seine Infektionsfähigkeit für Warmblüter einbüßt und sich in einen Bacillus umwandelt, der bei gewöhnlicher Temperatur wächst. Im Kaltblüter selbst fand er sowohl nach Einverleibung lebender wie toter menschlicher Tuberkelpilze typische Tuberkel, von deren histologischer Struktur aber nichts berichtet ist. Die lebenden Tuberkelpilze zeigten vom 12. Tage an Involutionsformen und Verzweigungen. Auch Sporenbildung will Dubard gesehen haben.

Diesen vollständigen, bereits nach so kurzer Durchleitung durch den Kaltblüter eintretenden Virulenzverlust der Tuberkelbacillen für Warmblüter konnten Auché und Hobbs (6) nicht bestätigen. Nach ihren Angaben waren menschliche Tuberkelbacillen noch nach 60-tägigem Verweilen im Froschkörper im stande, bei Meerschweinchen generalisierte Tuberkulose hervorzurufen. Ihre Virulenz erschien aber doch abgeschwächt, denn die Ausbreitung der Tuberkulose erfolgte langsamer als sonst. Kulturen, die noch nach 148 Tagen aus den Froschorganen angelegt wurden, boten niemals die von Bataillon, Dubard und Terre beschriebenen Veränderungen dar. Dagegen fanden die Autoren nach intraperitonealer Einverleibung der Tuberkelbacillen in den Froschorganismus ausgesprochen tuberkulöse Veränderungen in den Organen, verneinen jedoch eine Vermehrung der Pilze im Frosche bei gewöhnlicher Temperatur. Zu ähnlichen Resultaten gelangten Nicolas und Lesieur (7) durch Verfütterung von stark Tuberkelbacillenhaltigem Sputum an Fische. Die meisten Tiere (von 13 Tieren 11) gingen nach einigen Monaten ein; weder makroskopisch noch mikroskopisch ließen sich tuberkulöse Erkrankungen feststellen; Tuberkelbacillen waren nicht nachweisbar. Dagegen konnte durch Verimpfung von Darminhalt und Muskel auf Meerschweinchen festgestellt werden, daß sich die verfütterten Tuberkelbacillen virulent erhalten hatten. Eine weitere Nachprüfung der Versuche Bataillons und Terres, durch Verfütterung tuberkulösen Materiales bei Kaltblütern spezifische Krankheitserscheinungen hervorzurufen, sowie den Tuberkelbacillus an den Kaltblüter zu accommodieren, wurde von Hormann und Morgenroth (8) angestellt. Sie konnten bei Goldfischen durch Fütterung mit tuberkulösem Auswurf keine der Tuberkulose ähnliche Krankheit hervorrufen. Die Faeces der Fische wurden verschieden lange Zeit nach dem Aussetzen der Fütterung auf Meerschweinchen verimpft, welche später an Tuberkulose eingingen, oder nach der Tötung deutliche tuberkulöse Veränderungen zeigten. Es war somit der Beweis geliefert, daß die Ausscheidungen der Tiere noch mehrere Wochen, nachdem die Fütterung ausgesetzt war, lebende Tuberkelbacillen enthielten. Die Frage, ob die Tuberkelpilze in ihrer Virulenz durch die Passage durch den Fischkörper abgeschwächt worden sind, lassen Hormann und Morgenroth offen: Wenn 1 Meer-

schweinchen, das nach der 10. Woche getötet worden, keine sehr hochgradigen tuberkulösen Veränderungen zeigte, und aus einem anderen Versuche 1 Tier nach $6\frac{3}{4}$ Monaten an ausgebreiteter Tuberkulose einging, während noch 2 gleichzeitig mit demselben infizierte Tiere nach $6\frac{3}{4}$ Monaten gesund befunden wurden, so lassen die Autoren den Einwand zu, daß eine sehr geringe Anzahl von Tuberkelbacillen eingespritzt wurde, bzw. im Fall II eventuell eine Stallinfektion stattgefunden hat.

In vollständigem Widerspruch mit den angeführten Forschern steht Sion (9) mit seinen Resultaten. Frösche wurden teils vom Lymphsacke, teils von der Peritonealhöhle aus mit Tuberkelbacillen infiziert. „Niemals gelang ihm der Nachweis der Pilze in den inneren Organen, weder durch den Ausstrich des Organsaftes noch durch Untersuchung der Schnitte. In keinem Falle konnte er makroskopisch oder mikroskopisch irgendwelche Reaktion des Gewebes nachweisen.“ Sion glaubt, hiermit zu denselben Resultaten gekommen zu sein, wie Hormann und Morgenroth, Nicolas und Lesieur, wobei er übersieht, daß er durch Einverleibung der Tuberkelbacillen in den Lymphsack und die Peritonealhöhle von Fröschen sich auf ganz anderem experimentellen Boden bewegt hat, als die erwähnten Forscher mit den Fütterungsversuchen. Weiter stellt Sion in Abrede, daß die Pathogenität des Tuberkelbacillus im Organismus kaltblütiger Tiere irgendwie modifiziert werde.

Eingehend ist in jüngster Zeit von Lubarsch und Mayr (11) das Verhalten der Tuberkelpilze im Kaltblüter studiert worden. Nachdem ersterer bereits früher angegeben (10), daß die Tuberkelbacillen nach Einverleibung in den Rückenlymphraum von Fröschen sehr rasch in die inneren Organe gelangen und dort noch nach Monaten nachweisbar sind, sowie daß es am Impforte nicht selten zur Bildung kleiner Granulationen um die Pilzbröckel kommt, die histologisch dem Bilde der Fremdkörpertuberkel entsprechen, während in den inneren Organen für gewöhnlich keine oder nur sehr geringe Reaktion der Gewebe nachweisbar ist, schließlich daß die in den Organen deponierten Tuberkelbacillen nach wochenlangem Aufenthalte in denselben nicht mehr im stande sind, bei Meerschweinchen Tuberkulose hervorzurufen, hat derselbe neuerdings festgestellt, daß

1) auch beim Frosche die Pilze der Säugetiertuberkulose echte Tuberkel erzeugen können,

2) vielleicht eine Vermehrung, sicher aber keine erhebliche Verminderung der eingepfunden Tuberkelbacillen stattfindet,

3) die eingepfunden Tuberkelbacillen erhebliche morphologische und tinktorielle Veränderungen erleiden. Neben Einverleibung der Tuberkelpilze in den Lymphsack von Fröschen wurde auch die Infektion vom Intestinaltraktus aus versucht, und zwar so, daß die Tiere mit großen Mengen von Bouillonkultur menschlicher Tuberkulose gefüttert wurden. In den Faeces fanden sich reichliche Tuberkelbacillen; ebenso im Magen und Darminhalt. In Schnitten durch Magen und Darm ließen sich nur hier und da der Oberfläche der Schleimhaut anhaftende Tuberkelbacillen vereinzelt nachweisen. Im Gewebe dagegen, und besonders in Lymph- und Blutgefäßen konnten trotz genauer Durchsuchung vieler Schnitte keine Tuberkelbacillen gefunden werden; ebensowenig waren sie in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten zu entdecken. Trotzdem geben Lubarsch und Mayer die Möglichkeit eines Ueberganges der Tuberkelpilze in die inneren Organe — wenigstens für Fische — nach dem positiven Meerschweinschenversuch von Nicolas und Lesieur zu.

Fast gleichzeitig und unabhängig von Lubarsch und Mayr hat Verfasser (12) über Versuche berichtet, denen teilweise dieselben Fragen zu Grunde gelegt waren, und deren Resultate sich mit den Ergebnissen von Lubarsch und Mayer nahezu vollständig decken: Verschleppung der Tuberkelbacillen in alle Organe, Bildung charakteristischer, tuberkulöser Veränderungen in denselben, Schädigung der Form sowie Färbbarkeit der eingepflichten Tuberkelpilze, wahrscheinliche Verminderung der Virulenz der Bacillen nach längerem Verweilen im Kaltblüterorganismus.

Aus allen diesen Angaben ergibt sich die sicher feststehende Tatsache, daß die Tuberkelbacillen nach Einverleibung in den Rückenlymph- bzw. Bauchraum des Frosches ausnahmslos in die inneren Organe verschleppt werden, daß in diesen Organen charakteristische tuberkulöse Veränderungen hervorgerufen werden, und daß die eingebrachten Tuberkelbacillen ziemlich intensive morphologische Schädigungen erfahren.

Die Äußerungen über Eintritt von Virulenzabnahme bis zu völligem Virulenzverluste nach verschieden langem Aufenthalte der Tuberkelpilze im Kaltblüter erscheinen dagegen nicht einwandfrei, oder wenigstens nicht strikte beweisend. Alle bisherigen Versuche schließen die Möglichkeit nicht aus, daß der Warmblüter mit einer verhältnismäßig so geringen Menge von Mikroben infiziert worden ist, daß der teilweise verspätet eingetretene Tod der Meerschweinchen, andererseits der negative Befund damit erklärbar erscheint. Hormann und Morgenroth weisen auf diese Möglichkeit selbst hin, Nicolas und Lesieur konnten sogar in der verimpften Muskulatur überhaupt keine Tuberkelpilze nachweisen; auch dem von mir seinerzeit mitgeteilten Versuch kommt irgendwelche genügende Beweiskraft nicht zu.

Die Beeinflussung der Virulenz der Tuberkelbacillen durch den Kaltblüterorganismus erscheint an sich schon sehr bedeutungsvoll für die Kenntnis und Beziehungen der verschiedenen Arten derselben, andererseits ließe sich hoffen, durch systematische nach wiederholter Passage durch den Kaltblüter erfolgte Abschwächung schließlich zu einer für Warmblüter nahezu avirulenten Tuberkelbacillenkultur zu gelangen, mit welcher vielleicht eine Immunisierung von Warmblütern gegen virulente Tuberkelbacillen möglich wäre.

Es war demnach vor allem festzustellen:

- 1) Tritt eine Abschwächung virulenter Tuberkelbacillenkulturen nach Passage durch den Kaltblüterorganismus ein, und gegebenen Falles, nach welcher Zeit?
- 2) Zeigen die Kulturen nach längerem Aufenthalt im Froschkörper eine Aenderung oder Anpassung?

Die Infektion der Frösche geschah in der bereits früher mitgeteilten Weise durch Injektion von 1 ccm einer fein verriebenen, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten, möglichst gleichmäßigen Emulsion einer Tuberkelbacillenkultur in den Rückenlymphraum. Die Tiere wurden insgesamt bei gewöhnlicher Temperatur ohne Nahrung gehalten; das Wasser täglich erneuert. Bei Uebertragung der Tuberkelbacillen vom Kaltblüter auf den Warmblüter — Meerschweinchen — wurde folgendermaßen verfahren: Die ganze Leber, mit Ausnahme eines zur mikroskopischen Untersuchung bestimmten, etwa 1 qcm großen Stückchens, wurde herausgenommen, in 3 sterilen Wässern gewaschen, in steriler Schale zu einem Brei verrieben, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dem Meerschweinchen diese Emulsion

in die Abdominalhöhle injiziert. Fand sich im Rückenlymphraum eine größere Menge Exsudat oder ausgedehnte Granulationen, so wurde dasselbe mit steriler Spritze aufgesaugt bzw. die sulzigen Massen abgeschabt, in sterilem Wasser gewaschen, verrieben und mit zur Injektion verwendet. Die übrigen Organe — Lunge, Milz, Nieren, Hoden, Intestinaltraktus etc. — wurden nicht zur Injektion verwendet, sondern lediglich der mikroskopischen Untersuchung unterzogen, einerseits wegen ihrer Kleinheit — Milz —, andererseits, weil sie sich wegen ihrer Konsistenz — Lunge, Nieren — sehr schlecht zur breiigen Verkleinerung eignen.

Das klare Verständnis und die richtige Beurteilung der Impfvorseuche setzt vor allem eine äußerst genaue Kontrolle der Tuberkelbacillen in den zur Verimpfung benützten Organen voraus. Es wurden deshalb bei jedem Versuchstier sowohl die zur Infektion verwendete Leber, sowie auch die Mehrzahl der anderen inneren Organe einer eingehenden mikroskopischen Untersuchung in vielen Schnitten unterzogen. Nun ist der Nachweis der Tuberkelpilze im Gewebe der Kaltblüter besonders erschwert durch die Abnahme der Säurefestigkeit, worauf bereits Lubarsch und Mayr hingewiesen haben, sowie durch den Zerfall der Bakterien. Erstere kann nach längerer Zeit so erheblich sein, daß in Präparaten, die nach „Ziehl-Neelsen“ gefärbt und in gewöhnlicher Weise differenziert werden, keine Bacillen nachweisbar sind. Mindert man die Stärke der Entfärbungsflüssigkeit ab, so sind wohl die gut erhaltenen Pilze sichtbar, die schlecht sich färbenden, in Zerfall begriffenen, die Pilzfragmente und Körnchen dagegen werden durch die Kontrastfarbe gedeckt und das tatsächlich vorhandene, eventuell infektionstüchtige Material wird nicht erkannt. Nach Anwendung der verschiedenen für die Tuberkelbacillenfärbung angegebenen Methoden, sowie nach zahlreichen mißlungenen Versuchen ergab mir schließlich folgendes Verfahren die besten Resultate:

Färben der auf dem Objektträger aufgeklebten Schnitte 18—24 Stunden lang bei Zimmertemperatur in Karbolfuchsin Ziehl-Neelsen; 5—10 Sekunden langes Differenzieren der Präparate in 1-proz. salzsauerem Alkohol; längeres Auswaschen in destilliertem Wasser; keine Kontrastfarbe, Alkohol, Kanadabalsam. Das Gewebe ist schwach rosa, die Pilze oder deren Reste satt rot gefärbt.

(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität.

[Aus dem hygienischen Institute der deutschen Universität Prag
(Vorstand: Prof. Hueppe).]

Mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.

VII. Versuch einer Erklärung der Milzbrandempfänglichkeit des Kaninchens.

Von

Dozent Dr. **Oskar Ball**
Assistenten des Institutes.

und Dozent Dr. **Alfred Pettersson**
Stockholm.

(Schluß.)

Der Einwand, daß durch Zusatz der Organe irgendwelche nährenden Stoffe dem Serum beigemischt würden, die dadurch die Bakterienvernichtung verdeckten, wird, abgesehen von später auszuführenden Versuchen, schon durch den Hinweis auf die entgegengesetzte Wirkung z. B. der Milz in Ochsen- und Kaninchenserum beseitigt, vor allem aber durch die aus den Tabellen VIII und IX deutlich ersichtliche Art und Weise der Wirkung der Kaninchenorgane. Diese vielfältigst wiederholten und variierten Versuche lassen nämlich keinen Zweifel zu, daß die Aufhebung der milzbrandtötenden Serumwirkung so gut wie ausschließlich auf Bindung des Immunkörpers bei Unversehrtheit bleiben der Komplemente zurückzuführen ist¹⁾. Der Beweis dafür wird erbracht einerseits durch die ganz oder fast völlige Nutzlosigkeit eines Zusatzes frischen Kaninchensermums zu dem mit Organbrei behandelten, andererseits in der Tatsache, daß ein durch Organzellen an sich unwirksam gewordenes Kaninchenserum so gut wie früher und in der gleichen Menge irgend ein anderes, nur immunhaltiges Serum ergänzt.

Von welcher großen Bedeutung diese Verhältnisse im Tierkörper sein müssen, ergibt eine einfache Ueberlegung. Denn da alle Organe die Serumwirkung durch Bindung des darin befindlichen Immunkörpers aufheben und da das Blut mit allen Organen in innigste Berührung kommen muß, so kann es, mindestens innerhalb des Kapillarkreislaufes, nicht mit dem Blute verglichen werden, das man aus einem großen Gefäße in ein Reagenzglas auffängt. Verstäändlich wird der ganze Vorgang, wenn man sich Ehrlichs Anschauung anschließt, daß die im normalen Blute vorhandenen, auf Bakterien oder ihre Stoffwechselprodukte wirkenden Stoffe von Natur aus nicht gerade auf diese eingestellt sind. Sie üben irgendwelche, im einzelnen meist noch unbekannte, physiologische Funktionen aus, und es ist nichts viel anderes als ein Zufall, daß sie daneben auch noch Bakterien beeinflussen können.

Was gerade die Funktion der Immunkörper ist, die nebenbei dem Milzbrandbacillus sich anlagern können, läßt sich natürlich nicht ohne

¹⁾ Vergl. dazu: v. Dungern, Münch. med. Wochenschr. 1900. Wilde, Arch. f. Hyg. Bd. XLIV.

weiteres sagen; aber sehr weitverbreitet muß diese Funktion sein, da sich, wie früher gezeigt wurde, die Anwesenheit dieses Immunkörpers in fast allen untersuchten Blutarten durch Zusatz kleiner Mengen komplementhaltigen Serums nachweisen läßt. Gerade diese allgemeine Verbreitung bei den verschiedensten Tieren beweist, daß dieser Immunkörper, dessen Wirkungen im Reagenzglase so imponierend sein können, daß sie den Vergleich mit spezifischen Seris nicht zu scheuen brauchen, nicht direkt auf den Anthraxbacillus eingestellt ist; denn die allermeisten dieser Tiere sind ja hochempfindlich.

Man kann sich nun vorstellen, daß der Immunkörper, der, wie die erwähnten Versuche unzweideutig zeigen, als Ambozeptor zwei Gruppen, eine cytophile und eine komplementophile, haben muß, mit der Ersteren normalerweise in einen passenden Rezeptor, den wohl alle oder fast alle Zellen des Kaninchens haben, eingreift; mit Hilfe irgend eines Komplementes übt er dann an der Zelle seine physiologische Funktion aus. Diese Anlagerung an die Zellen findet nun jedenfalls ununterbrochen statt, so daß im Blute des lebenden Tieres, wenigstens innerhalb der Organe, der Immunkörpergehalt tatsächlich gar nicht derjenige ist, den man im extravaskulären Blute feststellt. Denn hier im Reagenzglase findet sich keine Gelegenheit, Immunkörper abzugeben, während im Tiere ein fortwährender Verbrauch stattfindet.

Aus dieser Vorstellung geht aber unmittelbar hervor, daß Bacillen, die ins Blut gelangen und mit dem Blute fortgeschleppt werden, ganz anderen Verhältnissen ausgesetzt sind als diejenigen, welche man im Glase einer gewissen Menge Blut oder Serum beifügt. Offenbar besteht hier ein zweifacher Vorgang; innerhalb der großen Gefäße liegen die Bedingungen ganz ähnlich wie beim bakteriziden Versuche: eine große Menge Blutes, welches zunächst, allerdings nur für Augenblicke lang, seine Immunkörper nicht abzugeben vermag, wirkt auf eine relativ kleine Menge von Bacillen ein. Innerhalb der Kapillaren in den Organen wird mit einem Schlage alles anders: der in feinste Aederchen zerteilte Blutstrom steht auf allen Seiten mit Zellen in Verbindung, die gierig die Immunkörper anziehen. Bacillen, die innerhalb der großen Gefäße sich befinden, werden somit wahrscheinlich den Immunkörper aufnehmen müssen, bei solchen, die in die Kapillaren kommen und hier stecken bleiben, ist die Wahrscheinlichkeit dafür wesentlich geringer. Für deren Beurteilung kommen wieder drei Möglichkeiten in Betracht: entweder ist die Affinität des Immunkörpers zum Bacillus geringer als die zum Zellrezeptor; dann wird der Bacillus überhaupt nicht beeinflußt werden. Oder die Affinität ist für Bacillus und Zelle die gleiche; dann hängt es rein vom Zufalle ab, wohin sich der Immunkörper wendet. Oder die Affinität zum Bacillus ist die überwiegende; dann lagert sich der Immunkörper innerhalb der Organe gerade so gut an, wie dies für das Blut innerhalb der großen Gefäße wahrscheinlich ist.

Nun ist zwar von vornherein zu betonen, daß die bloße Anlagerung des Immunkörpers noch keinen tödenden Einfluß auf den Bacillus auszuüben braucht; dazu gehört unter allen Umständen noch ein wirksames Komplement. Es müßte daher zunächst untersucht werden, ob ein solches innerhalb der Organe zur Wirkung gelangen kann. Wie sofort zu zeigen sein wird, liegen auch hier die Verhältnisse anders als im Reagenzglasversuche, so daß auch der Nachweis einer erfolgten Bindung des Immunkörpers an die Bacillen mit dem sofortigen Eingreifen des bakteriolytischen Komplementes, also der Abtötung, nicht gleichbedeutend

ist. Bei der Wichtigkeit, die aber trotzdem die Klarstellung der Affinitätsverhältnisse hat, seien zunächst diesbezügliche Versuche angeführt.

Es wurden zwei Methoden angewendet, um darüber ins klare zu kommen. Die eine ist eine indirekte und bietet den Vorteil, mit toten Bacillen arbeiten zu können und den Einwand etwaiger paralyisierender Wirkungen von Nährstoffen, welche die zugesetzten Organzellen enthalten, auszuschließen. Sie hat dafür den Nachteil, ganz unnatürliche Verhältnisse zu schaffen.

Das Prinzip ist folgendes: sowohl tote Milzbrandkulturen wie frische Organzellen machen ein Kaninchenserum unwirksam. Während dies aber im ersteren Falle durch gleichzeitige Hinwegnahme von Immunkörper und Komplement geschieht¹⁾, erfolgt die Inaktivierung durch Organe lediglich durch Absorption des Immunkörpers bei erhaltenem Komplement. Setzt man also einem frischen Kaninchenserum gleichzeitig Organzellen und tote Bacillen zu, so wird bei größerer Affinität des Immunkörpers zu den Bacillen das Komplement mitverschwinden müssen. Ein so behandeltes Serum wird also ein anderes, welches nur Immunkörper enthält, nicht mehr wirksam machen können. Wie die folgenden Versuche zeigen, tritt dieser Fall nicht ein, das Komplement bleibt ganz oder doch zum größten Teile erhalten.

Tabelle XI.

Die Eprovette A enthält 10 Tropfen Leberbrei, B 2 bei 100° abgetötete, in NaCl-Lösung gewaschene und durch Zentrifugieren möglichst von Flüssigkeit befreite Milzbrandagarkulturen, C enthält sowohl Leber wie Bacillen in den gleichen Mengen. Zugesezt werden je 2 $\frac{1}{2}$ ccm ganz frischen Serums, durch sofortiges Mischen erfolgt gleichmäßige Verteilung, worauf die Proben 1 Stunde bei 37° belassen und dann zentrifugiert werden.

Das Tier war nicht mit NaCl ausgewaschen worden, die Leber enthielt noch viel eigenes Blut.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Kaninchenserum aktiv		0
2) 1 " Serum A	1504 im Mittel	über 5000
3) 1 " " + 0,05 ccm aktives Kaninchenserum		
4) 1 " Schweineserum + 0,05 ccm Serum A		8
5) 1 " Kalbsserum + 0,05 " " "		0
6) 1 " Serum B		über 5000
7) 1 " " + 0,05 ccm aktives Kaninchenserum		
8) 1 " Schweineserum + 0,05 ccm Serum B		2896
9) 1 " Kalbsserum + 0,05 " " "		1892
10) 1 " Serum C		über 5000
11) 1 " " + 0,05 ccm aktives Kaninchenserum		
12) 1 " Schweineserum + 0,05 ccm Serum C		0
13) 1 " " + 0,05 " " "		1
14) 1 " "		über 5000
15) 1 " Kalbsserum		
16) 1 " Schweineserum + 0,05 ccm aktives Kaninchenserum		0
17) 1 " Kalbsserum + 0,05 " " "		2

Tabelle XII.

Kaninchen mit NaCl-Lösung durchspült. Zu je 2 $\frac{1}{2}$ ccm des ganz frischen Serums kommen teils 2 tote Milzbrandagarkulturen, teils zerriebene Organe, teils beides. Nach 1 Stunde Aufenthalt bei 37° werden alle Proben zentrifugiert und verteilt.

	Sofort	Nach 4 St d
1) 1 ccm Kaninchenserum		0
2) 1 " Ochsaenserum	2072 im Mittel	3472
3) 1 " " + 0,05 ccm Kaninchenserum		0
4) 1 " Schweineserum		über 8000
5) 1 " " + 0,05 ccm Kaninchenserum		0

1) Vgl. die erste Abhandlung dieser Untersuchungen, dieses Centralbl. 1903. No. 5; sowie Pettersson, dieses Centralbl. 1903.

		Sofort	Nach 4 Std.
6) 1	ccm Kaninchenser. mit Milzbrandbac. behand.		über 8000
7) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 6 bezeichneten Serums		3328
8) 1	" " " + 0,05 ccm akt. Kan.-Ser.		über 8000
9) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 6 bezeichneten Serums		über 8000
10) 1	" " " + 0,05 ccm akt. Kaninchenser.		ca. 8000
11) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 10 bezeichneten Serums		71
12) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 10 bezeichneten Serums		98
13) 1	" " " + 0,05 ccm akt. Kan.-S.		ca. 8000
14) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 14 bezeichneten Serums		103
15) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 14 bezeichneten Serums		88
16) 1	" " " + 0,05 ccm akt. Kan.-Ser.		1872
17) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 18 bezeichneten Serums		2256
18) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 18 bezeichneten Serums		1
19) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 18 bezeichneten Serums		5
20) 1	" " " + 0,05 ccm akt. Kan.-S.		ca. 5000
21) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 22 bezeichneten Serums		7
22) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 22 bezeichneten Serums		2
23) 1	" " " + 0,05 ccm akt. Kaninch.-S.		ca. 8000
24) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 26 bezeichneten Serums		22
25) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 26 bezeichneten Serums		136
26) 1	" " " + 0,05 ccm akt. Kan.-S.		ca. 8000
27) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 30 bezeichneten Serums		36
28) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 30 bezeichneten Serums		160
29) 1	" " " + 0,05 ccm akt. Kan.-S.		ca. 8000
30) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 34 bezeichneten Serums		11
31) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 34 bezeichneten Serums		17
32) 1	" " " + 0,05 ccm des mit No. 34 bezeichneten Serums		17

Die zweite, direkte Methode der Affinitätsbestimmung des Immunkörpers sucht die Verhältnisse, wie sie etwa im Kapillarkreislaufe der Leber bestehen, nachzuahmen.

Tabelle XIII.

In je 2 Eprovetten kommen 1, 2, 3 Tropfen Leberbrei. Dann wird überall je 1 ccm verdünntes Kaninchenserum (1:1 und 1:2) zugesetzt, worauf sofort die Einsaat erfolgt.

		Sofort	Nach 3 Std.	Nach 7 Std.
1) 1	ccm Kaninchenser. (1:1 m. NaCl-Lös. verdünnt)		4	0
2) 1	" " (1:1 " " ") + 1 Tr. Leber	1584	2000	
3) 1	" " (1:1 " " ") + 2 " "	1648	2042	
4) 1	" " (1:1 " " ") + 3 " "	1096	2524	
5) 1	" " (1:2 " " ")	15	1	
6) 1	" " (1:2 " " ") + 1 " "	2016	ca. 2000	
7) 1	" " (1:2 " " ") + 2 " "	1600	1895	
8) 1	" " (1:2 " " ") + 3 " "	1168	1984	

Danach dürfte man wohl berechtigt sein, die Affinität des Immunkörpers zum Milzbrandbacillus als wesentlich geringer wie die zu den Organellen zu bezeichnen. Daraus folgt unmittelbar, daß unter Verhältnissen, wie sie, den Versuchen vergleichbar, etwa im Kapillarsystem sich finden, der eingedrungene Bacillus unbehelligt bleibt.

Es fragt sich nun, ob sich die Uebertragung dieser außerhalb des Körpers erhaltenen Resultate auf den Kaninchenkörper selbst ermöglichen läßt, wobei die Möglichkeit des Eingreifens bakteriolytischer Komplemente vorausgesetzt wird. Dafür ergeben sich recht gewichtige Beweise. Bereits Wyssokowitsch¹⁾, dann Fodor²⁾ haben nachgewiesen, daß ins Blut

1) Wyssokowitsch, Zeitschr. f. Hyg. Bd. I.

2) Fodor, Deutsche med. Wochenschr. 1887. No. 34.

Tabelle XIV.

Aleuronatkaninchen verblutet und mit NaCl-Lösung durchspült. Zerriebene Leber, Niere, Milz, Knochenmark werden in verschiedenen Mengen, ferner die Verreibung von 3 kleinen Lymphdrüsen und ein Stückchen Muskel je 1 ccm Serum des gleichen Tieres zugesetzt, worauf sofort die Einsaat erfolgt.

Versuch mit denselben Organen und gleichzeitig mit dem der Tabelle XII angestellt.

		Sofort	Nach 4 Std.
1)	1 ccm Kaninchenserum		0
2)	1 " " + 1 Tropfen Knochenmark		0
3)	1 " " + 3 " "		27
4)	1 " " + 6 " "		152
5)	1 " " + 1 " Leber		1186
6)	1 " " + 3 " "		2208
7)	1 " " + 6 " "		3168
8)	1 " " + 1 " Niere		84
9)	1 " " + 3 " "		2336
10)	1 " " + 6 " "	2072 im Mittel	ca. 10 000
11)	1 " " + 1 " Milz		25
12)	1 " " + 3 " "		2704
13)	1 " " + Lymphdrüse		992
14)	1 " " + Muskel		3152

eingespritzte Bacillen binnen kürzester Zeit daraus verschwinden, daß sie aber innerhalb der Organe nachweisbar sind. Das würde durch Steckenbleiben in Kapillaren und die damit verbundene Unangreifbarkeit leicht zu erklären sein, wobei man gar nicht, wie Wilde¹⁾ annahm, an ein Zugrundegehen von Zellen zu denken braucht. Ein Zugrundegehen von Bacillen innerhalb der großen Gefäße des Kaninchens ist daher ebensowenig ausgeschlossen wie in der Peritonealhöhle²⁾ des Meer-schweinchens. Denn in diesem abgeschlossenen Cavum müssen die Verhältnisse eigenartig liegen und es gilt hier Aehnliches, was Wechs-berg³⁾ gegen die Versuche Wassermanns angewendet hat.

In bester Uebereinstimmung mit der dargelegten Anschauung befindet sich die Tatsache, daß es nur sehr schwer gelingt, die milzbrand-tötende Eigenschaft des Kaninchenserums durch Schädigungen des noch lebenden Tieres zu vernichten, ja daß auch die erfolgreiche Infektion nicht zu diesem Ziele führt. Der Immunkörper wenigstens kann nicht von den Bacillen aufgenommen werden. Weiterhin ist jetzt auch erklärt, warum bluthaltige Organe des Kaninchens unwirksam sind.

Es entsteht nunmehr sofort die Frage, welche Bedeutung eigentlich die Bindung des Immunkörpers an die Organzellen hat. Nach den durch zahllose Versuche herrschend gewordenen Anschauungen ermöglicht sie die Anlage eines Komplementes zum Zwecke der erfolgreichen Aus-übung einer bestimmten Wirkung. Was für ein Komplement das ist, darüber wurden eigene Versuche nicht angestellt; die Bedeutung der ganzen Verhältnisse für die vorliegende Untersuchung geht aber aus folgender Ueberlegung hervor. Behandelt man ein Kaninchenserum in genügender Menge mit toten Milzbrandbacillen, so wird es an sich un-wirksam und vermag andere immunkörperhaltige Sera nicht mehr zu ergänzen. Es sind sowohl Immunkörper wie Komplemente entfernt worden. Der Versuch beweist, daß die Verbindung Bacillus—Immunkörper—Komplement möglich ist. Setzt man einer anderen Hälfte des gleichen Serums Organzellen zu, so tritt zwar auch Unwirksamkeit ein, aber die Ergänzungsfähigkeit für fremde Sera bleibt ganz oder doch im

1) Wilde, a. a. O.

2) van Leent, dieses Centralbl. Bd. XXVIII. p. 737. Dasselbst Literatur.

3) Wechsberg, Zeitschr. f. Hyg.

wesentlichen erhalten. Es wurde somit nur der Immunkörper absorbiert. Wenn nun das Komplement nicht mit abhanden gekommen ist, so muß eine Hemmung vorhanden gewesen sein, welche das Zustandekommen der möglichen Verbindung Immunkörper—bakteriolytisches Komplement verhindert hat, und es liegt am nächsten, das Wesen der Hemmung in einem anderen nicht bakteriolytischen Komplemente zu suchen, das mit größerer Affinität zum Immunkörper sich in dessen komplementophile Gruppe einlagert.

Damit wäre aber wieder ein neuer Grund für die Unmöglichkeit der Abtötung von Milzbrandbacillen innerhalb des feinverteilten Blutumlaufer der Organe gegeben: Das bakteriolytische Komplement „paßt“ im Körper selbst nicht zum Immunkörper. Beweise dafür bieten zunächst die schon oben beschriebenen die Affinitätsverhältnisse des Immunkörpers betreffenden Versuche. Bei diesen wurden einerseits Bacillen im Ueberschuß, andererseits Organzellen gleichzeitig einer bestimmten Menge von Kaninchenserum zugesetzt. Obwohl in dem Kontrollversuche die Bacillen sich als wirksam erwiesen hatten, trat doch keine wesentliche Verminderung des Komplementgehaltes ein, mit anderen Worten die Verbindung Immunkörper—bakteriolytisches Komplement ist bei Anwesenheit von Organzellen unmöglich.

Ein weiterer Beweis ließ sich aus einer Unregelmäßigkeit, die bei den Versuchen mit Organen und Serum des gleichen Kaninchens manchmal auftrat, ableiten. Sie betrifft namentlich den Muskel. Dieser hatte in einzelnen Versuchen das Kaninchenserum nicht nur seiner bakteriziden Wirkung, sondern auch seiner Ergänzungsfähigkeit beraubt. In der folgenden Tabelle findet sich eine Zusammenstellung zweier Muskelversuche.

Tabelle XV.

Kaninchensera mit Muskel der blutliefernden Tiere in gewöhnlicher Weise behandelt.

		Sofort	Nach 4 Std.
A	1) 1 ccm Kaninchenserum	3408	0
	2) 1 „ Schafserum		} ca. 10 000
	3) 1 „ Hundeserum		
	4) 1 „ Schafserum + 0,05 ccm Kaninchenserum		31
	5) 1 „ Hundeserum + 0,05 „ „		460
	6) 1 „ Kaninchenserum mit Muskel behandelt		} über 8000
	7) 1 „ Schafserum + 0,05 ccm des mit No. 6 bez. Ser.		
	8) 1 „ Hundeserum + 0,05 „ „ „ „ 6 „ „		
B	9) 1 „ Kaninchenserum	1280	0
	10) 1 „ Schweineserum		ca. 10 000
	11) 1 „ „ + 0,05 ccm Kaninchenserum		0
	12) 1 „ Kaninchenserum mit Muskel behandelt		ca. 10 000
	13) 1 „ Schweineserum + 0,05 ccm des mit No. 12 bez. Ser.		0

Von diesen beiden Versuchen stellt B die Regel, A die Ausnahme dar. Aber die Ausnahme ist lehrreicher. Denn die Muskeln hatten hier in derselben Weise wie tote Milzbrandbacillen gewirkt, Immunkörper wie Komplemente absorbierend. Die Verbindung Immunkörper—Komplement ist also in besonderen Fällen doch auch bei Anwesenheit von Organzellen möglich. Entsprechend der vorigen Annahme, mußte in dem Versuche A der Tabelle zufällig das nicht bakteriolytische Komplement gefehlt haben. War diese Annahme richtig und gelang es, aus den zerriebenen Organen das nicht bakteriolytische Komplement wegzuschaffen, so mußten die davon befreiten Zellen nunmehr wie tote Bacillen auf Serum wirken können. Dies gelang relativ sehr leicht durch Erhitzung der Organzellen auf die gewöhnlich angewendete Inaktivierungstemperatur

von 58° oder auch 60°. Dadurch wird die Aufnahmefähigkeit der Zellen für die Immunkörper noch nicht sehr geschädigt, das nicht bakterizide Komplement aber ganz oder zum größten Teile zerstört. So erhitze Zellen binden dann sowohl Immunkörper wie Komplement.

Tabelle XVI.

Serum und Organe eines mit NaCl-Lösung durchspülten Kaninchens. Die Organverreibungen werden in je 2 gleiche Teile geteilt, wovon der eine vor dem Zusatz des Serums $\frac{1}{2}$ Stunde bei 58° gehalten wird. Mit dem Kaninchenserum bleiben beide Proben $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° und werden dann zentrifugiert.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Kaninchenserum		1
2) 1 " Schafserum		ca. 10 000
3) 1 " " + 0,05 ccm aktives Kaninchenserum		256
4) 1 " Schweineserum		ca. 10 000
5) 1 " " + 0,05 ccm aktives Kaninchenserum		0
6) 1 " Kaninchenserum mit Leber behandelt		3120
7) 1 " Schafserum + 0,05 ccm des mit No. 6 bez. Serums		76
8) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 6 " "		168
9) 1 " Kaninchenserum mit auf 58° erwärmter Leber beh.		5808
10) 1 " Schafserum + 0,05 ccm des mit No. 9 bez. Serums	350 im Mittel	} über 8000
11) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 9 " "		
12) 1 " Kaninchenserum mit Niere behandelt		
13) 1 " Schafserum + 0,05 ccm des mit No. 12 bez. Serums		
14) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 12 " "		
15) 1 " Kaninchenserum mit auf 58° erwärmter Niere beh.		
16) 1 " Schafserum + 0,05 ccm des mit No. 15 bez. Serums		
17) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 15 " "		
18) 1 " Kaninchenserum mit Hoden behandelt		
19) 1 " Schafserum + 0,05 ccm des mit No. 18 bez. Serums		
20) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 18 " "		
21) 1 " Kaninchenserum mit auf 58° erwärmtem Hoden beh.		
22) 1 " Schafserum + 0,05 ccm des mit No. 21 bez. Serums		
23) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 21 " "		

Im großen und ganzen entspricht der Versuch der Annahme, von welcher er ausging. Im Detail finden sich allerdings Besonderheiten, namentlich die, daß verschiedene Sera sich dem mit erwärmten Organen behandelten Kaninchenserum gegenüber verschieden verhielten. Dabei ist in diese Tabelle das merkwürdige Verhalten von Ochsen Serum nicht aufgenommen worden, das durch Zusatz von Kaninchenserum nach Einwirkung erhitzten Leberbreies sich nicht mehr, durch solches, welches mit erwärmter Niere behandelt war, noch genau so wie früher ergänzen ließ.

Etwas Ähnliches zeigt die folgende Tabelle p. 547.

Es wurde auf diese Unregelmäßigkeiten durch Vorführung von Versuchsmaterial etwas näher eingegangen, weil sich eine befriedigende Erklärung nicht finden ließ. Am nächsten läge es, an eine Bildung von Komplementoiden aus dem nicht bakteriolytischen Komplemente, das in der Leber enthalten ist, zu denken. Doch war das Auftreten der ganzen Erscheinung ein zu unbeständiges, als daß sich ein genaueres Studium daran hätte anknüpfen lassen. In der Hauptsache war jedenfalls nachgewiesen, daß eine vorübergehende Erwärmung der Organzellen auf 58° die Hemmung beseitigt, welche dem Zustandekommen der Verbindung Immunkörper—bakterizides Komplement im Wege steht. Damit war aber auch das Vorhandensein des nicht bakteriolytischen Komplementes wahrscheinlich gemacht.

Versuche, das beim Kaninchen Gefundene nunmehr auch für die Erklärung der Milzbrandempfindlichkeit anderer Tierarten anzuwenden,

Tabelle XVII.

Leber und Hoden eines mit NaCl-Lösung durchspülten Kaninchens wird teils unverändert, teils nach 1/2-stündiger Erhitzung auf 58° mit Serum des gleichen Tieres 1 Stunde bei 37° gehalten, dann zentrifugiert.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Kaninchenserum		0
2) 1 " Ochsen Serum		7000
3) 1 " " + 0,05 ccm Kaninchenserum		0
4) 1 " Hundeserum		ca. 10 000
5) 1 " " + 0,05 ccm Kaninchenserum		460
6) 1 " Kaninchenserum mit Leber behandelt		5200
7) 1 " Ochsen Serum + 0,05 ccm des mit No. 6 bez. Serums	2672 im Mittel	0
8) 1 " Hundeserum + 0,05 " " " " 6 " "		0
9) 1 " Kaninchenserum mit erhitzter Leber behandelt		ca. 5000
10) 1 " Ochsen Serum + 0,05 ccm des mit No. 9 bez. Serums		ca. 8000
11) 1 " Hundeserum + 0,05 " " " " 9 " "		ca. 8000
12) 1 " Kaninchenserum mit Hoden behandelt		ca. 8000
13) 1 " Ochsen Serum + 0,05 ccm des mit No. 12 bez. Serums		0
14) 1 " Hundeserum + 0,05 " " " " 12 " "		280
15) 1 " Kaninchenserum mit erhitztem Hoden behandelt		ca. 8000
16) 1 " Ochsen Serum + 0,05 ccm des mit No. 15 bez. Serums		41
17) 1 " Hundeserum + 0,05 " " " " 15 " "	ca. 8000	

In anderen Versuchen verhielt sich wieder ein anderes Serum abweichend, so in besonders auffälliger Weise ein Schweineserum in

Tabelle XVIII.

Leber eines mit NaCl-Lösung durchspülten Kaninchens wird zerrieben und in 3 Teile geteilt. Leber a bleibt unverändert, b wird 15, c 30 Minuten auf 58° erwärmt. Darauf Zusatz von je 2 1/2 ccm Kaninchenserum, das nach 1-stündigem Aufenthalte bei 37° abzentrifugiert wird.

	Sofort	Nach 4 Std.	
1) 1 ccm Kaninchenserum		0	
2) 1 " Ochsen Serum + 0,05 ccm Kaninchenserum		0	
3) 1 " Schweineser. + 0,05 " " "		0	
4) 1 " Schafserum + 0,05 " " "		0	
5) 1 " Kaninchenserum mit Leber a behandelt		8000	
6) 1 " Ochsen Serum + 0,05 ccm des mit No. 5 bez. Serums	980 im Mittel	31	
7) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 5 " "		0	
8) 1 " Schafserum + 0,05 " " " " 5 " "		992	
9) 1 " Kaninchenserum mit Leber b behandelt		} ca. 5000	
10) 1 " Ochsen Serum + 0,05 ccm des mit No. 9 bez. Serums			
11) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 9 " "			0
12) 1 " Schafserum + 0,05 " " " " 9 " "		ca. 4000	
13) 1 " Kaninchenserum mit Leber c behandelt			6000
14) 1 " Ochsen Serum + 0,05 ccm des mit No. 13 bez. Serums			6000
15) 1 " Schweineser. + 0,05 " " " " 13 " "			0
16) 1 " Schafserum + 0,05 " " " " 13 " "		3472	

konnten nur in unzureichendem Maßstabe ausgeführt werden. Hauptsächlich war daran die Schwierigkeit schuld, Blut und Organe desselben Tieres in genügender Reinheit zu erlangen. Kleinere Versuchstiere, wie Meerschweinchen oder Mäuse, liefern nicht genug Serum für solche Versuche. Bei allen diesen Tieren, deren Blut nicht bakterizid wirkt, kann es sich nur darum handeln, festzustellen, ob eine Bindung des im Blute vorhandenen Immunkörpers durch die Organe eintritt. Dies war namentlich beim Rinderserum mit seinem hohen Immunkörpergehalt von Wichtigkeit.

Tabelle XIX.

Ochsenserum mit Ochsenknochenmark, Leber und Milz in gewöhnlicher Weise 1 Stunde bei 37° behandelt, dann zentrifugiert.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Ochsenserum		5000
2) 1 " " + 0,05 ccm Kaninchenserum	792 im Mittel	0
3) 1 " " mit Knochenmark beh.		1367
4) 1 " " " " + 0,05 ccm K.-S.		376
5) 1 " " " Leber " " + 0,05 ccm K.-S.		6000
6) 1 " " " " " + 0,05 ccm K.-S.		6000
7) 1 " " " Milz " " + 0,05 ccm K.-S.		4000
8) 1 " " " " " + 0,05 ccm K.-S.		4000

Tabelle XX.

Kalbsserum mit Knochenmark, Leber und Milz in gewöhnlicher Weise behandelt.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Kalbsserum		3584
2) 1 " " + 0,05 ccm Kaninchenserum	284 im Mittel	10
3) 1 " " mit Knochenmark beh.		1424
4) 1 " " " " + 0,05 ccm K.-S.		1306
5) 1 " " " Leber " " + 0,05 ccm K.-S.		2256
6) 1 " " " " " + 0,05 ccm K.-S.		2928
7) 1 " " " Milz " " + 0,05 ccm K.-S.		} 5000
8) 1 " " " " " + 0,05 ccm K.-S.		

Tabelle XXI.

Schafserum mit Knochenmark, Leber und Milz des gleichen Tieres.

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Schafserum		5000
2) 1 " " + 0,05 ccm Kaninchenserum	792 im Mittel	5000
3) 1 " " mit Knochenmark beh.		3056
4) 1 " " " " + 0,05 ccm K.-S.		23
5) 1 " " " Leber " " + 0,05 ccm K.-S.		} 5-6000
6) 1 " " " " " + 0,05 ccm K.-S.		
7) 1 " " " Milz " " + 0,05 ccm K.-S.		
8) 1 " " " " " + 0,05 ccm K.-S.		

Die Versuche zeigen unzweideutig, daß auch bei diesen empfänglichen Tieren die Organe, soweit sie untersucht werden konnten, Immunkörper zu binden im stande sind. Nur ein Organ macht eine höchst bemerkenswerte, wenn auch nicht immer sehr deutliche Ausnahme, das Knochenmark. Abgesehen davon, daß es in einzelnen Versuchen dem betreffenden an sich ganz oder fast ganz unwirksamen Serum eine gewisse entwicklungshemmende Wirkung zu verleihen vermochte, war auch die Bindung des Immunkörpers durch die Markzellen eine unvollständige oder trat überhaupt nicht ein. Solche Verhältnisse kommen auch beim Kaninchen vor. Es war allerdings die Regel, daß das Knochenmark so gut wie die anderen Organe den Immunkörper festlegte und das Serum unwirksam machte. In einigen Fällen fand dieser Prozeß aber nur unvollständig, in anderen gar nicht statt. Es seien hier Versuche an 5 Kaninchen wiedergegeben (s. Tab. XXII. p. 549.)

Das weist im Zusammenhang mit den bei Rindern, Schafen und Schweinen gefundenen Tatsachen auf eine bestimmte Bedeutung des Knochenmarks hin und in der Tat finden sich alle Uebergänge bis zum Verhalten des Knochenmarks in natürlich immunen Tieren, wo die Verhältnisse klarer hervortreten. Darüber wird die nächste Abhandlung die Versuchsprotokolle bringen. Von seltener Durchsichtigkeit ist übrigens der in Tabelle XXI mitgeteilte Versuch mit Schafserum. Hier hatte, wie dies öfter geschieht, das Serum des Tieres überhaupt keinen Immunkörper enthalten, es ließ sich durch Kaninchenserum nicht ergänzen.

Tabelle XXIII.

Ochsen- und Schweineserum werden durch 1-stündige Behandlung bei 37° mit Kaninchenleukocyten, die nachher wieder abzentrifugiert werden, bakterizid gemacht. Zu je 1 ccm der ganz klaren Flüssigkeit kommen dann 1—3 Tropfen einer Verreibung von Ochsen- bzw. Schweineleber. Unmittelbar darauf erfolgt die Einsaat

	Sofort	Nach 4 Std.
1) 1 ccm Ochsenserum		3472
2) 1 " " mit Kaninchenleukocyten behandelt		0
3) 1 " des mit No. 2 bez. Serums + 1 Tropfen Ochsenleber	} 2778	} über 4000
4) 1 " " " " 2 " " + 2 " "		
5) 1 " " " " 2 " " + 3 " "		
6) 1 " Schweineserum		ca. 10 000
7) 1 " " mit Kaninchenleukocyten behandelt		0
8) 1 " des mit No. 7 bez. Serums + 1 Tropfen Schweineleber		} über 4000
9) 1 " " " " 7 " " + 2 " "		
10) 1 " " " " 7 " " + 3 " "		

1) Die starke Vernichtung von Milzbrandbacillen durch Kaninchen- serum im Reagenzglase findet im Tiere selbst entweder gar nicht oder nur unter ganz bestimmten Bedingungen (während kürzester Zeit in den großen Gefäßen, vielleicht in der Peritonealhöhle) statt.

2) Der Grund dafür liegt darin, daß der im Serum enthaltene Immunkörper überall dort, wo das Blut in Verbindung mit Körperorganen tritt, von Zellrezeptoren im Sinne Ehrlichs gebunden wird.

3) Die Affinität zu diesen Zellrezeptoren ist eine größere als zu den Milzbrandbacillen.

4) Mittels des Immunkörpers tritt ein seiner Natur nach nicht näher bekanntes, jedenfalls aber nicht bakteriolytisches Komplement an die Zellrezeptoren heran, so daß auch das im Serum enthaltene bakterizide Komplement mangels eines passenden Immunkörpers wirkungslos wird.

5) Der Milzbrandbacillus ist daher trotz der imponierenden bakteriziden Kraft, die das Kaninchen- serum außerhalb des Tierkörpers entfaltet, innerhalb der Kaninchenorgane keiner Gefährdung ausgesetzt.

Prag, 26. März 1903.

Nachdruck verboten.

Zur Theorie der natürlichen antibakteriellen Immunität.

[Aus dem hygienischen Institute der Universität Graz.]

Von Dr. Paul Theodor Müller,
Assistent am hygienischen Institute Graz.

(Fortsetzung.)

Es ist diese Beobachtung Bails übrigens noch in anderer Hinsicht von außerordentlichem Interesse. Bei der überaus kurzen Dauer, innerhalb welcher sich die gedachten Veränderungen an den Bakterien einstellen, ist natürlich die Vorstellung von vornherein abzuweisen, daß die erwähnten Agglutinophore etwa aus Lymphdrüsen, Milz und Knochenmark stammen könnten und von hier aus auf dem Wege des Säftestromes in die Peritonealhöhle gelangt wären. Vielmehr wird man ohne Zweifel annehmen müssen, daß es die die Peritonealhöhle umgrenzenden Gewebe (und eventuell die dahin ausgewanderten Leukocyten) selbst sind, von welchen diese Antikörperproduktion ausgeht. Daß in der Tat die letztere durchaus nicht allein an die bereits mehrfach genannten blut-

bildenden Organe gebunden ist, haben vor allem die schönen Untersuchungen von Römer (20) über die Abrinimmunität gezeigt, nach welchen auch die primär geschädigten Gewebe des Konjunktivalsackes merklich an der Antiabrinbildung beteiligt waren¹⁾.

Fassen wir die Ergebnisse der bisherigen Betrachtungen nochmals kurz zusammen, so können wir also sagen, daß

1) die Antikörperproduktion außerordentlich rasch schon innerhalb weniger Stunden nach erfolgter Infektion einsetzt (oder einsetzen kann) und daß

2) die primär geschädigten Gewebe der Infektionsstelle an derselben wesentlich beteiligt sind (oder sein können).

Da ferner eine gewisse Zeit erforderlich ist, ehe die schädigenden Substanzen vom Ort der Infektion in die anderen zur Produktion von Antikörpern geeigneten Organe gelangen, so wird man weiterhin im allgemeinen annehmen können, daß

3) die erste Entstehung der Antikörper an der Infektionsstelle erfolgt und daß die anderen Organe erst später zu reagieren beginnen. Vorausgesetzt ist hierbei natürlich, daß die Resorption der bakteriellen Substanzen nicht allzu schnell stattfindet.

Wenn nun Deutsch (21) in seinen Untersuchungen über den Entstehungsort der Typhusantikörper zu dem Schlusse gelangt: „les anticorps ne se forment pas au niveau de l'injection faite“, und zwar auf Grund der Tatsache, daß er in dem peritonealen Exsudate, das nach der Injektion entstanden war, in 15 Fällen bedeutend geringere Schutzwirkung konstatieren konnte als im Serum und in den lymphoiden Organen, so ist damit doch nur ein scheinbarer Widerspruch gegenüber unseren früheren Auseinandersetzungen gegeben, um so mehr, als er selbst angibt, daß „dans 4 cas l'exsudat renfermait presque autant d'anticorps que le sérum“. Da nämlich, wie bereits erwähnt, die Bakterien die Fähigkeit besitzen, sehr bedeutende Mengen von Antikörpern zu binden und dadurch dem direkten Nachweis zu entziehen, so kann es uns nicht wundern, wenn das peritoneale Exsudat in der ersten Zeit nach der Injektion trotz etwa erfolgter reichlicher Produktion von Schutzstoffen keine merkliche Vermehrung derselben erkennen ließe. Denn das übliche, auch von Deutsch eingeschlagene Verfahren zum Nachweise der Antikörper gestattet nur, dieselben im freien Zustande aufzufinden, nicht aber im gebundenen, unwirksamen. — Später hingegen, wenn bereits ein beträchtlicher Teil der bakteriellen Substanzen entweder im gelösten Zustande auf dem Wege des Säftestromes oder im Leibe von Wanderzellen aus der Peritonealhöhle fortgeschafft und in den lymphoiden Organen abgelagert wurde, wird einerseits der Anreiz zur Antikörperproduktion an der ursprünglichen Infektionsstelle bereits ein viel geringerer geworden sein, während andererseits in den genannten Organen

1) Vor kurzem hat auch v. Dungern eine ähnliche, hierher gehörige Beobachtung gemacht, indem er lokale Antikörperbildung an den Zellen der vorderen Augenkammer des Kaninchens nachweisen konnte, wenn demselben das Blutplasma von *Maja squinado* A an dieser Stelle injiziert worden war. Da in den ersten Tagen nach der Injektion das Blut des Kaninchens noch frei von Antikörpern war, der Humor aqueus bereits präzipitinhaltig gefunden wurde, so konnte über die Provenienz des Präzipitins kein Zweifel herrschen. „Damit“, folgert v. Dungern, „ist aber der beste Beweis dafür geliefert, daß nicht nur besondere Organe, sondern alle möglichen Zellen Antikörper liefern können“. (Die Antikörper. Jena 1903.)

eine lebhaftere Reaktion und Bildung von Schutzstoffen einsetzt, womit die Befunde von Deutsch ihre einfache Erklärung finden. Dieselben beweisen also nur, daß die Hauptmasse der Antikörper im Verlaufe der Immunisierung nicht am Orte der Infektion entsteht. Ob aber, besonders zu Anfang, die Infektionsstelle überhaupt an der Antikörperproduktion beteiligt ist oder nicht, darüber können dieselben nach der Art, wie sie angestellt wurden, gar keinen Aufschluß geben. Es lag übrigens diese Fragestellung offenbar auch gar nicht in dem Plane der genannten Arbeit.

Die Folgerungen, die sich nun hieraus ergeben, sind außerordentlich naheliegend. Hat an irgend einer Körperstelle eine Infektion mit pathogenen Mikroorganismen stattgefunden und haben dieselben durch den von ihnen gesetzten Reiz in den umliegenden Geweben eine rasche Produktion von Antikörpern nach dem früher besprochenen Typus hervorgerufen — ein Vorgang, den man vielleicht treffend als lokale Schnellimmunisierung bezeichnen könnte —, so werden ohne Zweifel die neugebildeten spezifischen Antikörper ganz wie bei den Bailschen Versuchen sofort von den Bakterien verankert werden und ihre deletären Wirkungen auf dieselben entfalten müssen. Daß dieser Vorgang nicht gleichgültig für den ganzen Verlauf der Infektion sein kann, ist wohl einleuchtend, und man wird sich vorstellen können, daß unter günstigen quantitativen Verhältnissen zwischen den produzierten Antikörpern und den Bakterien eine vollkommene Vernichtung der letzteren und damit eine Verhütung einer schwereren Erkrankung zu stande kommen kann, ganz ähnlich, wie eine solche im künstlich immunen Organismus zu beobachten ist. Hiermit wären wir also ganz von selbst dazu gelangt, eine weitere Erklärungsmöglichkeit der natürlichen Immunität resp. Resistenz ins Auge zu fassen, welche im Gegensatz zu den älteren humoralen Theorien nicht annimmt, daß die Waffen, die dem Organismus im Kampfe mit den Bakterien zur Verfügung stehen, schon vorgebildet und in den Körpersäften parat liegen, sondern welche dieselben erst im Momente der eingetretenen Infektion entstehen läßt¹⁾ also im hohen Grade der Forderung genügt, das Problem dynamisch aufzufassen. Die verschiedenen Grade der Resistenz würden sich hiernach durch die verschiedene Schnelligkeit und Intensität erklären, mit

1) Wie erwähnt, nahmen auch Denys und Kaisin, sowie, gestützt auf deren Versuche, Kruse an, daß unter Umständen erst im Moment der Infektion bakterizide Substanzen gebildet würden. Es unterscheidet sich jedoch die Auffassung dieser Autoren in zwei wesentlichen Punkten von der oben dargelegten. Erstens nämlich wurde, wenigstens von seiten Denys' und Kaisins, die Veränderung im ganzen Bluteserum gesucht, während sie nach dem oben Auseinandergesetzten zunächst nur die Infektionsstelle betrafte und sich erst viel später im übrigen Organismus bemerkbar machen könnte. Zweitens aber — und dies ist die entscheidende Differenz — sahen die genannten Forscher in den neu auftretenden bakterienfeindlichen Substanzen nicht spezifische Immunkörper, sondern sie faßten sie als „Alexine“, d. i. als die normalerweise vorhandenen Schutzstoffe auf, welche nur unter dem Einflusse der Infektion reichlicher produziert würden als sonst; im obigen hingegen ist gerade die Identität des supponierten reaktiven Vorganges mit dem der spezifischen Immunisierung betont.

In ähnlichem Sinne wie Kruse äußert sich auch Flügge in der neuen Auflage seines Grundrisses der Hygiene, indem er anführt, daß „offenbar nicht der momentane Gehalt des Blutes an Alexinen, der im Reagenzglas zur Wirkung gelangt, für die Immunität von Bedeutung ist, sondern die Schnelligkeit, mit der im Bedarfsfalle Alexine mobil gemacht werden können. Zweifellos wird ein Körper, der wenig Alexine im Blute hat, doch über reichliche Bildungsstätten und Depots verfügen können, von denen aus sich der Alexinegehalt des Blutes immer rasch wieder ergänzt“ (p. 603).

welcher die celluläre Reaktion der Neubildung von spezifischen Schutzsubstanzen einsetzt. Zugleich würde diese Betrachtungsweise die tiefe Kluft zu überbrücken im stande sein, welche heute noch vielfach — wie mir scheint, in etwas künstlicher Weise — zwischen der angeborenen und erworbenen (spezifischen) Immunität aufrecht erhalten wird. Denn in beiden Fällen wären die hierbei ins Spiel kommenden Kräfte ganz analoge; nur das eine Mal über den ganzen Körper generalisiert, das andere Mal auf die Infektionsstelle beschränkt, Unterschiede, welche natürlich nur davon abhängig zu denken wären, inwieweit es zu einer Vermehrung und Resorption von unveränderten, d. i. durch die Bindung von Antikörpern noch nicht unschädlich gemachten bakteriellen Substanzen kommt. Um allen Mißverständnissen von vornherein zu begegnen, möchte ich hier sogleich betonen, daß ich mit diesen Erörterungen durchaus nicht beabsichtige, etwa die bestehenden Theorieen der natürlichen Immunität durch eine neue verdrängen oder ersetzen zu wollen; worauf es mir hier ankommt, ist nur, einige Folgerungen darzulegen, die sich mir aus bekannten Tatsachen ungezwungen zu ergeben scheinen, und dieselben zur Diskussion zu stellen.

Um daher auch den bestehenden Theorieen möglichst gerecht zu werden, möchte ich hier noch kurz die Eventualitäten zusammenstellen, durch welche in den Organismus eingedrungene Bakterien abgetötet und eine weitere Ausbreitung des Infektionsprozesses verhütet werden könnte. Die in die Gewebe gelangten Mikroorganismen könnten nun zunächst

1) von Phagocyten aufgenommen und zerstört werden, im Sinne von Metschnikoffs Phagocytentheorie;

2) könnten dieselben durch die normalen bakteriziden Eigenschaften der Gewebsflüssigkeiten vernichtet werden (Alexintheorie)¹⁾;

3) könnte eine durch Afflux von Leukocyten bedingte Steigerung der normalen bakteriziden Eigenschaften der Säfte die eingedrungenen Bakterien unschädlich machen (modifizierte Alexintheorie);

4) könnte eine lokale Schnellimmunsierung im oben auseinandergesetzten Sinne zur raschen Antikörperproduktion und so zur Vernichtung der Mikroorganismen führen. Und endlich

5) wenn alle derartigen reaktiven Vorgänge von seiten des befallenen Organismus ausbleiben, könnten dieselben, wie Baumgarten annimmt, infolge Nahrungsmangel und osmotischer Störungen in den Gewebsäften zu Grunde gehen. Natürlich können sich alle die genannten Faktoren auch gleichzeitig und in wechselnden Verhältnissen an der Vernichtung der eingedrungenen Mikroorganismen beteiligen.

Nun ist natürlicherweise — und ich bin weit davon entfernt, mir dies zu verhehlen — von einer logischen Deduktion, wie ich sie im obigen zu geben versuchte, zu dem tatsächlichen Nachweise, daß der geschilderte Mechanismus der „lokalen Schnellimmunsierung“ wirklich eine Rolle bei der natürlichen Immunität zu spielen vermag, noch ein weiter Schritt. Wenn ich gleichwohl diese Spekulationen nicht unterdrücken zu sollen glaubte, so geschah dies zum Teil deshalb, weil auch die anderen zur Erklärung der natürlichen Immunität aufgestellten

1) Erwähnt sei übrigens, daß Ehrlich mit Recht in seinem Vortrage über „die Schutzstoffe des Blutes“ darauf hinweist, daß der Ausdruck „Alexin“ nicht mehr dem gegenwärtigen Stande der Wissenschaft entspricht, da dadurch eine falsche unitarische Vorstellung erweckt werde. Die künstlich erzeugten wie die natürlichen bakteriziden Substanzen sind vielmehr als komplexer Natur anzusehen und entfalten ihre Wirkung nach genau dem gleichen Mechanismus.

Hypothesen sich derzeit noch nicht allgemeiner Anerkennung erfreuen und weil gerade das Ausmaß, in welchem sich die oben zusammengestellten bakterienfeindlichen Faktoren an dem Zustandekommen der Widerstandsfähigkeit beteiligen, von verschiedenen Seiten die verschiedenste Bewertung erfährt. Zudem möchte ich — um es nochmals zu betonen — die obigen Auseinandersetzungen nicht so sehr im Sinne eines neuen Erklärungsversuches als im Sinne einer neuen Fragestellung aufgefaßt wissen, welche ja auch für den Fall, daß es sich als verfehlt erweisen sollte, immerhin zur Auffindung neuer Tatsachen führen könnte.

II.

Kehren wir nunmehr wieder zu dem eingangs besprochenen Problem der natürlichen Immunität und ihrer Aufhebung durch gewisse Schädlichkeiten zurück, so liegt es nahe, auf Grund der im ersten Abschnitte dieser Arbeit gegebenen Erörterungen die folgende Frage aufzuwerfen: Gelingt es überhaupt, durch derartige Eingriffe, welche erwiesener- und anerkanntermaßen die natürliche Immunität bestimmter Tiere herabzusetzen im stande sind, auch einen Einfluß auf deren Antikörperproduktion zu nehmen oder nicht? Es ist klar, daß, falls das Experiment auf diese Frage eine verneinende Antwort geben sollte, falls also eine merkliche Aenderung der Antikörperproduktion unter dem Einflusse solcher Prozeduren nicht zu konstatieren wäre, daß dann die oben auseinandergesetzten Anschauungen wesentlich an Wahrscheinlichkeit verlieren müßten.

Der Nachweis der veränderten — vermehrten oder verminderten — Produktion der spezifischen Immunsbstanzten könnte nun in doppelter Weise geführt werden. Entweder nämlich an der Applikationsstelle der dem Tiere einverleibten Bakterienkulturen oder, dem allgemeinen Gebrauche entsprechend, im Blute bzw. im Blutserum. Wenn nun auch die erstere dieser beiden Versuchsanordnungen mit Rücksicht darauf, daß sie sich eng an die obigen Auseinandersetzungen anschließen würde, für unsere Zwecke entschieden den Vorzug verdienen dürfte, so stehen derselben doch eine Reihe technischer Schwierigkeiten gegenüber, welche wir bereits mehrfach angedeutet haben und als deren hauptsächlichste wohl die sofortige Bindung der neugebildeten Immunsbstanzten an die Bakterienleiber und die relativ geringe Höhe der lokalen Antikörperproduktion angesehen werden dürfte. Mußten nun auch diese Umstände den Versuch eines direkten Nachweises der gebildeten Antikörper an der Infektionsstelle von vornherein als aussichtslos erscheinen lassen, so war es doch immerhin denkbar, daß vielleicht ein indirekter Weg zum Ziele führen konnte. Ich habe daher versucht, in Anlehnung an die bereits zitierten Experimente Bails festzustellen, ob sich quantitative Differenzen bei dem Verluste der Agglutinierbarkeit konstatieren lassen, welchen Typhusbacillen erleiden, nachdem sie normalen und geschädigten Versuchstieren (Tauben) intraperitoneal injiziert wurden. Wie ich gleich bemerken möchte, haben jedoch diese Experimente, welche allerdings noch nicht vollkommen abgeschlossen sind, keine besonders ermutigenden Resultate ergeben, so daß ich von deren Wiedergabe hier absehen möchte und wir somit darauf angewiesen sind, den zweiten angedeuteten Weg zu betreten und die etwa zu Tage tretenden Differenzen der Antikörperproduktion im Blutserum zu studieren.

Bevor ich jedoch zur Besprechung meiner diesbezüglichen Versuche

übergehe, muß ich noch einer Arbeit Erwähnung tun, welche, allerdings von ganz anderen Gesichtspunkten aus, über verwandte Experimente berichtet. Abbott und Bergey (22) haben sich die Aufgabe gestellt, den Einfluß per os verabreichten Alkohols auf folgende Faktoren zu untersuchen: 1) auf den Komplementgehalt des Kaninchenblutes, 2) auf die hämolytische Fähigkeit des Serums von Kaninchen, welche bereits vor Verabreichung des Alkohols gegen eine fremde Blutart immunisiert worden waren und 3) auf den Prozeß der künstlichen Immunisierung gegen fremdes Blut selbst. Wie man sieht, liegen die beiden ersteren Fragestellungen unserem Gedankengange etwas ferner, während die dritte sich mit demselben vielfach berührt, da ja auch die chronische Alkoholeinwirkung zu jenen Schädlichkeiten gehört, welche die Widerstandsfähigkeit des Organismus herabzusetzen im stande sind.

Das Ergebnis dieser Versuche war nun, daß die alkoholisierten Tiere die Injektionen fremden Blutes außerordentlich schlecht vertrugen und schon nach wenigen Einspritzungen eingingen, während die normalen Kontrolltiere diesen Eingriff anstandslos überlebten, was mit den ähnlichen Versuchsergebnissen von Deléarde, Laitinen, Valagussa und Raneletti etc. im besten Einklange steht, welche die Widerstandsfähigkeit der Alkoholtiere gegenüber Bakterien und Bakteriengiften beträchtlich vermindert fanden.

Ob aber die Entstehung des spezifischen hämolytischen Zwischenkörpers bei den alkoholisierten Kaninchen gehemmt oder verlangsamt war, darüber machen Abbott und Bergey wenigstens in ihrer mir bis jetzt allein zugänglichen vorläufigen Mitteilung keinerlei Andeutung, so daß also gerade die uns von unserem Standpunkte aus am meisten interessierende Frage durch diese Arbeit keine Beantwortung findet. Es war jedoch die Kenntnis dieser Abhandlung für uns in einer anderen Richtung von großem Werte, insofern dieselbe nämlich auf die Notwendigkeit hinwies, zu derartigen Versuchen, wie wir sie planten, möglichst widerstandsfähige Tierspecies zu verwenden, wenn dieselben nicht durch die große Anzahl von Tierverlusten, die zu gewärtigen waren, gänzlich illusorisch gemacht werden sollten.

Um zu vermeiden, daß diese Experimente einen allzu großen Umfang annähmen, mußte ich mich zunächst darauf beschränken, eine einzige Tierspecies und einen einzigen Modus der Schädigung in Betracht zu ziehen, möchte mir jedoch vorbehalten, diese Versuche mit anderen Arten und mit abgeänderter Methode in der nächsten Zeit weiterzuführen.

Als sehr geeignetes Versuchstier erwies sich nun für meine Zwecke die Taube, welche die durch längeres Hungernlassen gesetzte Stoffwechselstörung gut genug verträgt, um gleichzeitig eine Immunisierung mit verschiedenen Bakterienarten zu gestatten¹⁾. Gewöhnlich wurde die erste Injektion erst 2—3 Tage nach Beginn der Hungerperiode vor-

1) Bemerkte sei, daß nach Möglichkeit stets Tiere gleicher Rasse verwendet wurden und insbesondere feinere Zuchtrassen, welche sich als weit weniger widerstandsfähig erwiesen, von vornherein ausgeschlossen wurden. Ebenso wurden ausgewachsene Tiere nur mit ausgewachsenen verglichen, nicht mit jungen, welche begrifflicherweise durch die Nahrungsentziehung in ganz anderer Weise geschädigt werden. Hierdurch wurde wenigstens ein Teil der Fehlerquellen ausgeschaltet, welche in den individuellen Verschiedenheiten der Versuchstiere gelegen sind.

genommen¹⁾ und nach weiteren 2—4 Tagen wiederholt. Manchmal wurde auch noch eine dritte Einspritzung — stets intraperitoneal — gegeben und das Hungertier dann zugleich mit dem genau ebenso behandelten, nur gefütterten Kontrolltiere am 10., 11. Tage nach Beginn der Nahrungsentziehung durch Verblutenlassen aus den Flügelgefäßen getötet. Das durch ausgiebiges Zentrifugieren abgeschiedene Serum wurde dann zur Ausführung der makroskopischen Agglutinationsreaktion verwendet, indem stufenweise abnehmende Mengen desselben in enge Glasröhrchen gebracht, mit Bouillon auf das Volumen von 1 ccm ergänzt und darauf mit je 1 ccm der frischen Bakterienaufschwemmung (24-stündige Agarkultur) versetzt wurden. Nach 2-stündigem Aufenthalte der Röhrchen im Brutschranke wurde die eingetretene oder ausgebliebene Agglutination notiert und die von den Hungertieren herrührenden Proben mit denen der Kontrolltiere verglichen.

Es braucht wohl kaum besonders hervorgehoben zu werden, daß in dieser alleinigen Berücksichtigung einer einzigen Gattung der neugebildeten spezifischen Antikörper, nämlich der Agglutinine, eine weitere absichtliche Einschränkung der oben viel allgemeiner gehaltenen Fragestellung gelegen ist, und daß man nur mit einer gewissen Vorsicht von dem Verhalten der Agglutinine auf das der anderen Immunsbstanzen wird Schlüsse ziehen dürfen.

Ich gehe nunmehr an die Wiedergabe meiner Versuchsprotokolle. Die Experimente wurden mit den folgenden Bakterienarten angestellt:

- 1) *Bact. typhi abdominalis*.
- 2) *Bac. pyocyaneus*.
- 3) *Bac. dysenteriae* Kruse.
- 4) *Vibrio Metschnikoff* (sehr wenig virulent).
- 5) *Bac. proteus*.

In derselben Reihenfolge sind auch die Protokolle angeordnet.

(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Ueber den Gehalt der einzelnen Eiweissfraktionen des Serums an Choleraimmunkörpern.

Eine Entgegnung an Herrn A. Wolff.

[Aus dem k. k. serotherapeutischen Institute (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem patholog.-chem. Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung“ (Vorstand: Dr. E. Freund) zu Wien.]

Von Dr. E. P. Plek.

In einer mir soeben zugekommenen Arbeit gelangt Herr A. Wolff auf Grund der Nachprüfung meiner Arbeit zu Resultaten, die den meinigen widersprechen. Unter Vorbehalt einer eingehenden Würdigung seiner Angaben im Zusammenhange mit meinen fortgeführten Unter-

1) Es ist dies mit Rücksicht auf die von Canalis und Morpurgo festgestellte Tatsache von Bedeutung, daß Hühner nur dann für Milzbrand durch Nahrungsentziehung empfänglich gemacht werden können, wenn dieselbe mindestens 3 Tage vor der Infektion beginnt.

suchungen über den gleichen Gegenstand will ich vorläufig in Kürze einige wesentliche Punkte in Wolffs Mitteilung richtigstellen.

Wolff hat unter Verkennung des Wesens der Methode in keinem einzigen Versuche seiner Arbeit die von mir angegebene Versuchsanordnung benutzt, und es sind daher die aus seinen Versuchen sich ergebenden Schlüsse für die Ergebnisse meiner Arbeit in keiner Weise stichhaltig.

Die von Wolff bei Anwendung des schwefelsauren Ammons zum Zwecke der Ausfällung der Choleraantikörper erlittenen Verluste an Immunkörpern sind nicht auf eine schädliche Einwirkung des Salzes zurückzuführen, sondern lassen sich bei zweckmäßigem, methodischem Arbeiten vermeiden; die Angabe Wolffs steht überdies vereinzelt gegenüber den seit meiner Arbeit erschienenen zahlreichen, von Wolff aber nicht zitierten Publikationen anderer Autoren (Fuhrmann, Rodhain, P. Th. Müller, Eisenberg, Landsteiner etc.), in denen bei Anwendung der fraktionierten Ammonsulfatfällung eine quantitative Ausbeute der verschiedensten Immunkörper in bestimmten Eiweißfraktionen angegeben worden war. Andererseits ist für die von Wolff angeführte Tatsache, daß eine Wiederholung der Globulinfällung mit Ammonsulfat, im Gegensatze zur einmaligen Fällung, keinerlei Verluste herbeiführt, aus den von Wolff beigelegten Versuchsprotokollen kein Beleg zu erbringen, ebensowenig wie dafür, daß der Immunkörperwert sich um ein Bedeutendes höher darstelle, wenn die Dauer der Ammonsulfateinwirkung eine kürzere ist.

Da sich die von mir benutzte Prüfungsmethode der Wertbestimmung der Choleraantikörper von den Angaben Pfeiffers im Wesen nicht unterscheidet — die von mir gebrauchte Oese war keine Normalöse — so können die von den meinigen abweichenden Resultate Wolffs nur in der mangelhaften chemischen Methodik Wolffs ihre Erklärung finden.

Ich zweifle nicht, daß Herr Wolff bei größerer Uebung, strenger Einhaltung der von mir befolgten Methodik und Beachtung der Grundprinzipien chemischen Arbeitens zu Resultaten gelangen wird, die mit den meinigen übereinstimmen. Es liegt daher in den Angaben Wolffs kein Grund vor, von den Ergebnissen meiner Arbeit abzugehen, die ich vielmehr in ihrem vollen Umfange aufrecht erhalte. Eine triftige Ursache hierfür liegt unter anderem auch darin, daß nach unseren Erfahrungen die von Wolff angefochtene Methode zur Darstellung hochwertiger Diphtherieimmunsere für therapeutische Zwecke verwendbar ist.

Nachdruck verboten.

Bemerkungen zu vorstehender Entgegnung.

Von Dr. Alfred Wolff in Berlin.

Auf die vorstehende Entgegnung von Herrn Pick habe ich folgendes zu erwidern:

Die Richtigstellung einiger „wesentlicher“ Punkte seitens Pick beschränkt sich auf die Erklärung, daß ich unter Verkennung des Wesens der Methode in keinem einzigen Versuche die von ihm angegebene Ver-

suchs-anordnung benutzt hätte. Er fügt jedoch nicht hinzu, worin die Fehler bestanden haben sollen. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß in der Methodik irgend welche Differenzen bestehen, jedenfalls habe ich jedoch unter gehöriger Kontrolle genau nach dem von Pick angegebenen Protokoll, cf. Hofmeisters Beiträge, gearbeitet. Pick hätte doch wenigstens in seiner Entgegnung angeben sollen, in welchen Punkten ich nach seiner Ansicht in meiner Arbeit von seiner Technik abgewichen bin. Ich hatte in meiner Arbeit erwähnt, daß meine Resultate sich vollkommen mit den von Pfeiffer und Proskauer mit Magnesiumsulfat erhaltenen decken, und auch in dieser Entgegnung berührt er leider wieder nicht den in seiner ersten Arbeit ebenfalls nicht besprochenen Punkt, aus welchem Grunde die Magnesiumsulfat-Methode zur Ausfällung der Globuline nicht als einwandfrei zu betrachten ist, denn über die chemische Eignung der genannten beiden Autoren wird er doch wohl nicht ein gleiches vernichtendes Verdikt fällen, wie über die meine.

Ueber Deutung von Versuchen kann man natürlich im Zweifel sein, den Vorwurf jedoch, daß ich für die von mir angeführten Tatsachen, daß die Wiederholung der Globulinfällung mit Ammoniumsulfat keine Verluste herbeiführte im Gegensatz zur einmaligen, ferner daß der Immunkörperwert sich um ein bedeutendes höher darstellt, wenn die Ammoniumsulfateinwirkung eine kürzere ist, keine Protokolle angeführt habe, muß ich als absolut unrichtig zurückweisen. Auf Seite 717 der damaligen Arbeit im Centralblatt für Bakteriologie führte ich ein Protokoll an, in dem bei einem Serum mit einem Titer $\frac{1}{6000}$ der Titer der Globulinfällung unter 3500 lag, während nach zweimaliger Wiederholung der Fällung der Titer noch über 2000 lag, so daß ich mit Recht die Schlußfolgerung zog, es ist kein wesentlicher weiterer Verlust durch wiederholte Fällung eingetreten, wie er der ersten Fällung entspricht. Auf Seite 718 findet sich das Protokoll, daß das Euglobulinfiltrat einen Titer $\frac{1}{1000}$ hatte, daß nach 8 Tagen bei einem mit $\frac{1}{1000}$ immunisierten Tier diese Dosis nicht mehr schützte, und daß nach 14 Tagen der Titerwert auf zwischen $\frac{1}{500}$ — $\frac{1}{750}$ sank, woraus doch wohl für jeden nicht Voreingenommenen ein Absinken des Titerwertes bei verlängerter Ammoniumsulfateinwirkung zu folgern ist.

Auf die von mir in bakteriologischer Beziehung gemachten Einwände gegen die Picksche Methodik gehe ich hier nicht wieder ein, sondern verweise auf die ursprüngliche Arbeit, da Pick gegen diese Einwände absolut nichts vorgebracht hat. Ich möchte nur hervorheben, daß ich die abweichenden Resultate ausdrücklich nicht auf die — relativ unwesentliche — Verschiedenheit der benutzten Platinösen geschoben habe.

Ich will Pick es gern hingehen lassen, wenn er meine Resultate auf mangelhafte chemische Methodik zurückführt, jedoch wenn er glaubt, als Forscher, der wesentlich auf chemischem Gebiete gearbeitet hat, einem mehr bakteriologisch und morphologisch Geschulten die Fähigkeit zur chemischen Arbeit absprechen zu dürfen, so möchte ich es doch aussprechen, daß der Schöpfer unserer Kenntnis über Choleraimmunität mindestens in gleichem Maße das Recht hat, über die bakteriologische Technik von Herrn Pick ein Urteil zu fällen. Auch brauche ich wohl nicht hervorzuheben, daß ich nicht ohne absolute — nicht bloß formelle — Zustimmung Pfeiffers die Angriffe gegen Pick in bakteriologischer Beziehung niedergeschrieben hätte.

Wie die Streitfrage betreffs des Gehaltes der Immunkörper schließ-

lich entschieden werden wird, lasse ich dahingestellt, und liegen hier die Verhältnisse in chemischer und bakteriologischer Beziehung viel zu verwickelt, als daß ich ein Urteil aussprechen möchte, wie sich in Zukunft diese Frage gestalten wird, wo es doch heute noch fraglich ist, wie sich eine spätere Zeit überhaupt zu den feinen Unterscheidungen der einzelnen Eiweißarten auf Grund der Fällungsgrenzen stellen wird.

Wenn meine Technik Herrn Pick so angreifbar erscheint, warum erklärt er nicht die von mir auf p. 713 erwähnten, nach seinen eigenen Protokollen, also gewiß doch durch chemisch einwandfreie Methode gewonnenen Resultate? Er hat dort ein Serum, dessen Titer auf 2200 bis 2400 angegeben wird — das jedoch nach den für Titration geltenden Regeln nicht als zu Ende titriert anzusehen ist, da das mit dieser Serumverdünnung (passiv) immunisierte Tier noch mit dem Leben davonkam; es muß also der Titer noch höher angenommen werden; von den 2200—2400 Einheiten findet Pick im Euglobulin nur 1600—2000, im Pseudoglobulin dagegen 200—400, also ca. den 7. Teil. Die Differenz im Immunkörpergehalt der Euglobulinreaktion zum Vollserum beträgt, wenn wir Picks Zahlen als richtig ansehen, $\frac{1}{3}$ des Gesamtwertes; wenn wir den Immunkörpergehalt des Serums jedoch höher ansetzen, wozu wir nach unseren obigen Ausführungen berechtigt sind, wird die Differenz noch größer.

Daß das Ammoniumsulfat eine Schädigung und Vernichtung der Immunkörper bewirkt, scheint mir sicher, woran es jedoch liegt, ist jedoch eine andere Frage. Herr Geheimrat Brieger hatte die Liebenswürdigkeit, mich darauf hinzuweisen, daß er bei seinen Untersuchungen über die verschiedenen in Typhusbakterien enthaltenen Agglutination auslösende Proteinstoffe eine schädigende Einwirkung des sauren Ammoniumsulfats bemerkt habe. Das Ammoniumsulfat reagiert infolge dissociativer Vorgänge mehr oder weniger sauer, und diese Säuerung kann möglicherweise an dem Verlust von Immunkörpern schuld sein. Brieger stumpft diese Säurebildung mit Ammoniumkarbonat ab. Einige Versuche, die in dieser Richtung angestellt wurden, haben einen weitaus geringeren Verlust an Immunkörpern ergeben, doch werden erst weitere Nachprüfungen zeigen können, ob es sich hier um konstante Verhältnisse handelt, oder ob Schwankungen der Virulenz der Cholerakultur (deren Virulenz hier in Berlin nicht so ohne alle Schwankungen blieb, wie seiner Zeit in Königsberg) Beobachtungsfehler vorgetäuscht haben. Jedenfalls scheinen durch die Ausschaltung der Säurewirkung die chemischen Verhältnisse von neuem überaus kompliziert.

Ueber die Verwendungsmöglichkeit der durch Ausfällungen gewonnenen Sera zu therapeutischen Zwecken habe ich mich überhaupt nicht ausgesprochen; die Möglichkeit liegt natürlich vor. Ich habe nur gesagt, daß nach dem Ergebnis unserer Versuche eine derartige therapeutische Verwendung vor der des Vollserums keine Vorzüge aufweisen würde, falls man nicht etwa nachweist, daß körperfremdes Globulin bei der Injektion besser vertragen wird, als körperfremdes Gesamtserum.

Nachdruck verboten.

Zur Agglutination der Streptokokken.

[Aus dem k. k. serotherapeutischen Institute (Prof. Paltauf) und der k. k. Universitätskinderklinik (Prof. Escherich) in Wien.]

Von Dr. Paul Moser und Dr. Clemens Frh. v. Pirquet.

[Mit 1 Tafel und 5 Figuren im Text.]

In einer früheren Arbeit hat der eine von uns gezeigt, daß das Serum von Pferden, welche mit Streptokokkenstämmen aus dem Herzblute Scharlachkranker immunisiert waren, den Krankheitsprozeß des Scharlachs in spezifischer Weise beeinflußt¹⁾.

Da eine Unterscheidung der bei Scharlach vorkommenden Streptokokken von solchen anderer Herkunft in ihrem kulturellen Verhalten nicht gelungen war, lag es nahe, nach anderen Kriterien zu suchen, welche eine solche Abgrenzung ermöglichen.

Schon im Jahre 1897 hatte van de Velde einen ganz ähnlichen Weg eingeschlagen, und danach als der erste die Agglutination der Streptokokken beschrieben²⁾.

Er isolierte 21 Streptokokkenstämmen, verwendete zwei davon zur Immunisierung von Kaninchen und fand, daß das Serum des immunisierten Tieres wohl den homologen, nicht aber den heterologen Stamm agglutiniert.

Den Agglutinationsversuch stellte er makroskopisch an; bei Zusatz von 1 Teil des homologen Serums auf 50 Teile Bouillon sah er nach 20 Minuten bei 37° Flockenbildung und Bodensatz, während die Kontrollbouillon trübe blieb. Bordet³⁾ untersuchte mikroskopisch, sah keine vollständige Agglutination bei Einwirkung des Marmorekschen Serums auf Streptokokken.

In analoger Weise untersuchte Bensaude⁴⁾ die Wirkung der Marmorekschen und mehrerer anderer Immunsera, sowie des Serums von Menschen, welche an Streptokokkenkrankungen litten, auf eine Anzahl von Streptokokkenstämmen verschiedenen Ursprungs. Er beobachtete die Reaktion auch mikroskopisch, fand mehrmals Agglutination, aber keine Gesetzmäßigkeit. Die Versuche van de Veldes wurden im Jahre 1899 von Moser nachgeprüft und bestätigt⁵⁾.

Neuerdings hat Aronson⁶⁾ wieder auf die Agglutination der Streptokokken aufmerksam gemacht; er hält nur die makroskopische, nicht aber die mikroskopische für charakteristisch.

1) Moser, Ueber die Behandlung des Scharlachs mit einem Scharlach-Streptokokkenserum. Berlin (Karger) 1903.

2) Sur la nécessité d'un sérum antistreptococcique polyvalent etc. (Arch. de méd. expér. Paris 1897.)

3) Contribution à l'étude du sérum antistreptococcique. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1897. p. 177.)

4) Bensaude, L., Le phénomène de l'agglutination des microbes. Paris (Carré) 1897. — Besançon et Griffon, Pouvoir agglutinatif du sérum dans les infections expérimentales et humaines à pneumococques. (Soc. de biol. Paris. 1897.)

5) Kraus, R., Ueber Agglutination. (Akten des IX. internat. Kongresses für Hygiene u. Demographie in Madrid 1900.) — Derselbe, Wiener klin. Wochenschr. 1899. No. 5.

6) Aronson, Untersuchungen über Streptokokken- und Antistreptokokkenserum. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 42.)

Er fand, daß sein Antistreptokokkenserum alle untersuchten Stämme bei der Verdünnung von 1 : 30 vollkommen, 1 : 40 unvollkommen agglutiniere, während normales Pferdeserum keine Agglutination bewirkte.

Meyer¹⁾ hingegen behauptet, daß das Aronsonsche-Serum nur den homologen Streptococcus agglutiniere; andere Stämme meist nur dann, wenn sie gleichfalls durch Mäusepassage virulent gemacht sind. Er bediente sich gleichfalls der makroskopischen Methode.

I. Technische Ausführung der Agglutination.

Die Streptokokken wurden in schwach alkalische Bouillon geimpft und diese nach 24—48-stündigem Verweilen im Brütschranke, wenn genügendes Wachstum eingetreten war, zur Agglutination verwendet.

Die Bouillon wird mittels der Pipette einige Zeit durchgeblasen, bis sie ganz gleichmäßig getrübt ist, und hierauf je 1,5 ccm in sterile Eprouvetten verfüllt. Dazu kommt je 0,5 ccm Serumverdünnung.

Diese erfolgt in derselben alkalischen Bouillon, um eine Aenderung des spezifischen Gewichts zu vermeiden.

Als Verdünnungsmodus verwendeten wir stets die geometrische Reihe 4, 16, 64, 250 etc.

Nach Zusatz des Serums blieben die Eprouvetten bei Zimmertemperatur stehen und wurden nach 16—24 Stunden beobachtet. Die Agglutination erfolgt nämlich bei Zimmertemperatur zwar etwas langsamer, aber ebenso sicher, und es werden dadurch Irrtümer, die durch das Wachsen verunreinigender Keime entstehen könnten, eher vermieden.

Nach der Aufstellung der makroskopischen Agglutination wird denselben Röhren sowie der Kontrollbouillon je ein Tropfen zur mikroskopischen Beobachtung entnommen und im hohlen Objektträger gleichfalls bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Wo nur mikroskopische Agglutination ausgeführt wurde, verwendeten wir Tröpfchenverdünnung: statt Röhren mit je 1,5 ccm zu beschicken, werden auf mehrere hohle Objektträger mittels einer gebauchten, kapillar endigenden Pipette je 3 Tropfen der Streptokokkenbouillon aufgetropft. Auf dem ersten Objektträger wird ein Tropfen Serum zugesetzt, durch mehrmaliges vorsichtiges Aufziehen gemischt und von dieser Verdünnung 1 : 4 (1 Serum auf 4 Gesamtfüssigkeit) 1 Tropfen in den nächsten Behälter fallen gelassen u. s. w.

Dadurch entsteht ebenfalls die geometrische Reihe 4, 16, 64 etc., das ist 4^1 , 4^2 , 4^3 ... 4^n , welche wir kurzweg mit dem Exponenten als „Verdünnung 1, 2, ... n^4 “ bezeichnen.

Im folgenden gilt also Verdünnung $1 = \frac{1}{4}$, $2 = \frac{1}{16}$, $3 = \frac{1}{64}$, $4 = \frac{1}{250}$ (statt $\frac{1}{256}$), $5 = \frac{1}{1000}$, $6 = \frac{1}{4000}$, $7 = \frac{1}{16000}$, $8 = \frac{1}{64000}$, $9 = \frac{1}{250000}$.

Diese letztere Methode ist sehr sparsam: 1 Tropfen Serum und 2 ccm Bouillon genügen, die Verdünnungen 1 : 4 bis 1 : 250 000 auszuführen. Die Ungenauigkeit, welche durch die Ungleichheit der Tropfen bedingt ist, wird durch die ausschließliche Anwendung der geometrischen Reihe unschädlich gemacht, deren Faktor 4 weite Fehlergrenzen erlaubt.

Die Tröpfchenverdünnung gibt aber — dadurch, daß wir dieselbe Pipette zu den weiteren Verdünnungen benutzten, wobei kleine Mengen

1) Meyer, Die Agglutination von Streptokokken. [Vorl. Mitteil.] (Dtsche med. Wochenschr. 1902. Okt.)

Serum an derselben haften — höhere Agglutinationswerte als die Verdünnung in Kubikcentimetern, so zwar, daß die 5. Verdünnung in Tröpfchen, welche 1 : 1000 sein sollte, nur der 4. Kubikcentimeterverdünnung entspricht. Die darin gefundenen Zahlen haben also nur relativen Wert.

Dementsprechend haben wir die quantitative Auswertung des hochagglutinierenden Immuserums nur auf die Kubikcentimeterverdünnung basiert.

II. Vorgang der Agglutination bei den Streptokokken.

Die makroskopische Agglutination der Streptokokken unterscheidet sich in nichts von den analogen Erscheinungen bei anderen Mikroorganismen.

Einige Stunden (Zimmertemperatur) nach der Aufstellung zeigt sich in der diffus trüben Bouillon die Bildung zarter Flöckchen, welche allmählich zu Boden fallen; die Bouillon wird klar.

Dem biologischen Vorgange treten wir viel näher durch die Beobachtung des Serumeinflusses unter dem Mikroskope.

Wir benutzten zu diesen Studien hauptsächlich den aus dem Herzblute eines Scharlachkranken gezüchteten *Streptococcus XIV* (Lindner), welcher schnell wächst, die Bouillon trübt und mikroskopisch stets das gleiche Bild gibt.

Die ersten Spuren der Agglutination zeigen sich bereits nach wenigen Minuten (Versuche 1, 3, 4). Während die Kontrolle kurze, in Molekularbewegung tänzelnde Kettchen in ganz gleichmäßiger Verteilung aufweist (Zeichnung 1), bilden sich am Grunde des mit Serum versetzten Tropfens kleine, manchmal verzweigte Gruppen durch Anlagerung mehrerer Ketten. Die übrige Flüssigkeit ist noch gleichmäßig mit Kettchen erfüllt. All-

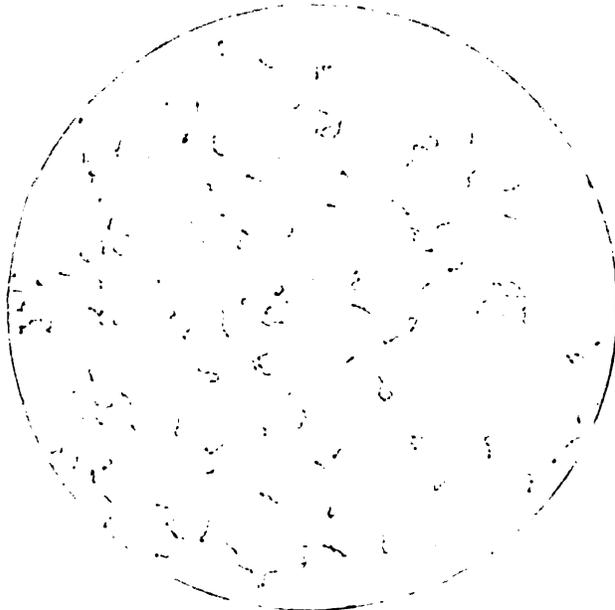


Fig. 1.

mählich senken und vereinigen sich nun auch diese, und nach Verlauf von einer halben Stunde sind fast alle Streptokokken in kleinen Gruppen versammelt.

Weiterhin lagern sich die Gruppen aneinander und bilden größere Haufen (Photogramm 2), zwischen denen zuletzt das ganze Feld frei wird (Zeichnung 2, Photogramm 4).

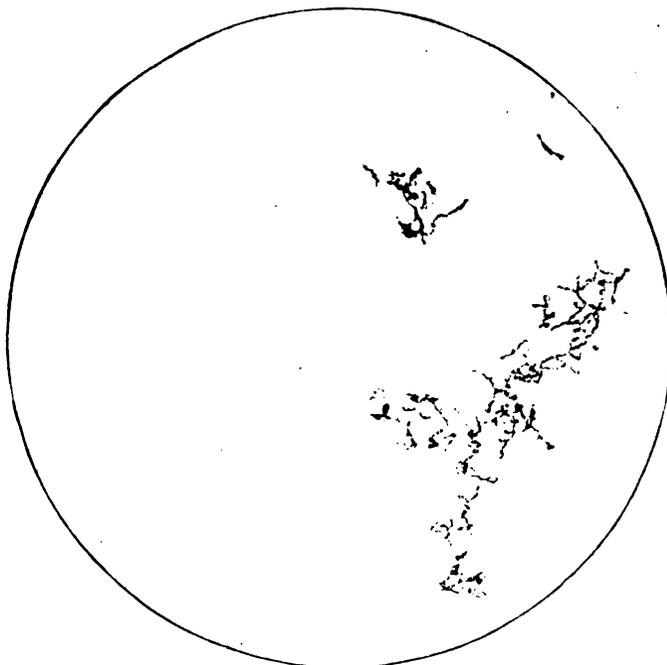


Fig. 2.

Diese Stufe bezeichnen wir als vollkommene Agglutination, „a“, wobei wir das Hauptaugenmerk darauf legen, daß keine freien Einzelketten neben den Haufen zu finden sind.

Dort, wo das Serum durch große Verdünnung an die Grenze seiner Wirksamkeit gelangt ist, bleiben die Gruppen klein (Zeichnung 3); zwischen ihnen finden sich unbeeinflusste Einzelketten. Oder es trennen sich nur peripher die Gruppen scharf ab, die Mitte bleibt undifferenziert (halbe Agglutination $\frac{a}{2}$).

Gehen wir noch weiter in der Verdünnung, so sehen wir bloß eine unregelmäßige Gruppierung der Streptokokken in dichteren Wolken mit dünner besäten Zwischenfeldern (Spuren von Agglutination = $\frac{a}{4}$).

Im Kontrolltropfen senken sich auch allmählich die Streptokokken zu Boden (nach 1—4 Tagen) und gleiten bis zum tiefsten Punkte, der Tropfenmitte. Dort finden wir dann eine zentrale, undifferenzierte, gleichmäßige Körnchenmasse (Photogramm 1), an deren Rande freie Kettchen sich in molekularer Bewegung befinden.

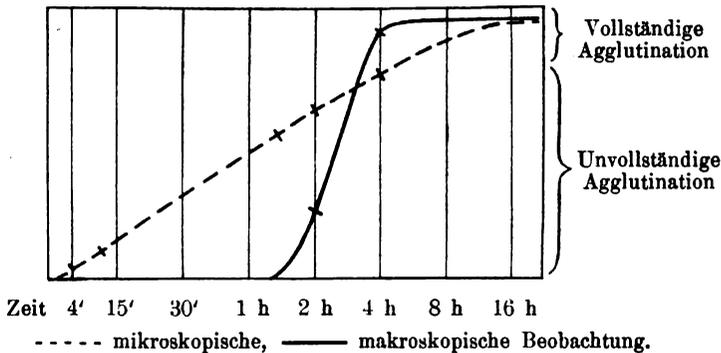
Die beigelegten Zeichnungen sind mittels einer Zeiss'schen Camera

nach dem Bilde im hohlen Objektträger verfertigt, während die zweite Serie durch Mikrophotographie der gefärbten Agglutination gewonnen ist¹⁾.

Woher kommt es nun, daß makroskopisch die Agglutination so viel später in Erscheinung tritt als mikroskopisch? Die kleinsten Gruppierungen der Streptokokken entgehen dem bloßen Auge, welches dann erst eine flockige Trübung bemerkt, wenn sich größere Konglomerate gebildet haben. Sobald diese entstanden sind, senken sie sich ziemlich rasch zu Boden, während sich mikroskopisch noch eine weitere Ausbildung des agglutinierenden Vorganges erkennen läßt, nämlich das Aneinanderrücken der Häufchen zu einem größeren Haufen.

So sehen wir in Versuch 1, daß nach 2 Stunden die Agglutination mikroskopisch in den meisten Verdünnungen schon deutlich ist, während sie makroskopisch kaum begonnen hat und nur in einigen Röhrchen nachweisbar ist.

Fig. 3. Zeitlicher Eintritt der makroskopischen und mikroskopischen Agglutination im Konzentrationsoptimum. Versuch vom 5. Dez. und 15. Jan.



Nach 20 Stunden besteht ein ähnliches Verhältnis bei jenen Verdünnungen, wo es überhaupt nicht zur Sedimentierung kommt.

Hier zeigt die makroskopische Methode eine schärfere Grenze: Verdünnung 5 ist sedimentiert, 6 zeigt Niederschlag neben leichter Trübung, 7 ist trübe wie die Kontrollbouillon, wogegen wir im Mikroskope noch in Verdünnung 8 Spuren der Agglutination bemerken.

Dieses Verhältnis ist wahrscheinlich so zu erklären, daß Spuren agglutinierender Substanz wohl genügen, um die Streptokokken aneinander zu kleben, nicht aber, um so kompakte Flocken zu bilden, daß sie sedimentieren, und das spezifische Gewicht merklich über das der Nährflüssigkeit zu erhöhen (Versuch 5).

Aus den Versuchen 1 und 2 sehen wir aber noch eine andere Erscheinung. Die Agglutination beginnt nicht, wie theoretisch zu erwarten wäre, dort, wo die meisten Agglutinine vorhanden sind, sondern in höheren Verdünnungen²⁾.

Dies könnte dadurch bedingt sein, daß in den stärksten Konzentrationen die Eiweißlösung des Serums durch ihren Molekulargehalt oder durch ihr spezifisches Gewicht eine hemmende Wirkung ausübt.

1) Deckglas mit den Tröpfchen lufttrocken, Härtung in Formalinalkohol, Gram-Färbung.

2) Eisenberg und Volk, Untersuchungen über die Agglutination. (Zeitschr. f. Hygiene. 1901.)

Diese Erklärung ist aber nicht zutreffend (Versuch 2). Serum von geringerer Agglutinationskraft bringt nämlich in der stärksten Eiweißkonzentration (1 : 4) eine schnellere Agglutination zu stande, als das hochagglutinierende in den geeignetsten Verdünnungen.

Nach mehreren Stunden tritt aber dann auch hier meist Agglutination ein, die mikroskopisch sich insofern von der primären unterscheiden läßt, daß die Streptokokken, statt diskrete Haufen zu bilden, zu großen Netzen vereinigt sind.

Versuch 1.

15. Januar 1903. Streptococcus XIV, S. Bertram.
Verdünnung in Kubikcentimetern.

Makroskopisch	Mikroskopisch
Nach 1 Stunde: alle Röhren wie Kontrolle	Verdünnung. 1 $\frac{1}{4}$, 2-5 $\frac{1}{2}$, am stärksten 4, 6 7 $\frac{1}{4}$, 8-10 wie Kontrolle
2 Std.: Verdünnung. 3, 4, 5 zarte Flöckchen, obere Schicht klarer, in 4 am deutlichsten	Verdünnung. 1 $\frac{1}{4}$, 2-6 $\frac{1}{2}$, 7 $\frac{1}{4}$, 8-10 \emptyset
4 Std.: Verdünnung. 3-5 agglutiniert, Bodensatz, Flüssigkeit fast klar, einige zarte Flöckchen. Verdünnung. 1, 2, 6-10 wie Kontrolle	
5 Std.: Verdünnung. 1 flockige Trübung ohne Bodensatz, 2 klarer, etwas Satz, 3-5 klar, 6 leicht trübe (wie 2), 7-10 wie Kontrolle	Verdünnung. 1 $\frac{1}{2}$, 2 fast a (sehr wenige Einzelketten), 3-6 a, 7 $\frac{1}{4}$, 8 Spuren von Gruppenbildung, 9 10 wie Kontrolle
20 Std.: Verdünnung. 2-5 a, 1, 6 fast klar, 7-10 \emptyset	Verdünnung. 1 fast a, 2-6 a, 7 $\frac{1}{4}$

Versuch 2.

15. Januar 1901. Streptococcus XIV, S. Aronson (ohne Trikresolzusatz), ebenso aufgestellt.

2 Std.: Verdünnung. 1 flockige Trübung, kein Satz, fast klar	Verdünnung. 1 a, 2 $\frac{1}{2}$, 3-6 wie Kontrolle
5 Std.: Verdünnung. 1 Bodensatz, 2 feinflockige Trübung ohne Satz, 3-6 wie Kontrolle	Verdünnung. 1 a, 2 fast a (wenige Einzelketten), 3-6 wie Kontrolle
20 Std.: Verdünnung. 1 2 klar, 3 geringer Satz, trübe wie Kontrolle 4-6	Verdünnung. 1, 2 a, 3 $\frac{1}{4}$, 4-6 wie Kontrolle

Versuch 3.

5. Dezember. Streptococcus XIV, Serum Bertram; Tröpfchenverdünnung.

Nach 4 Minuten: Beginnende Gruppenbildung in Verdünnung. 5	
„ 12 „ Gruppenbildung ausgesprochen in 4, 5 und 6, beginnend in allen Verdünnungen, mit Ausnahme von 1. Die Gruppen zeigen sich am Boden des Tropfens, im übrigen Tropfen sind die Streptokokken noch gleichmäßig verteilt, in 4 und 5 aber nicht mehr so dicht wie in den übrigen	
„ 90 „ Verdünnung. 4-8 zeigen nur mehr kleine Gruppen am Grunde, die Flüssigkeit darüber ist frei von Streptokokken. In Verdünnung. 2, 3 und 9 schwimmen noch solche, in Verdünnung. 1 beginnt erst die Gruppenbildung	

Versuch 4.

27. August. Streptococcus XIV, Serum Egmont. Kubikcentimeterverdünnung.

Nach 45 Minuten: Verdünnung. 4 fast nur Gruppen. Verdünnung. 1-3, 5-9 Beginn von Gruppenbildung. Verdünnung. 10 wie Kontrolle	
„ 90 „ Verdünnung. 4 fast keine Einzelketten, alles in kleinen Häufchen. In den höheren und geringeren Verdünnungen zunehmend Einzelketten	

„ 24 Stunden: Verdünnung. 1 mittelgroße Haufen, 2 netzartige Haufen, viele Einzelketten, 3 weniger Einzelketten, 4, 5 netzartige Haufen, fast keine Einzelketten (Zeichnung 2), 6, 7 kleine Haufen, 8 Gruppen, viele Einzelketten, 9 wenige Gruppen, hauptsächlich Einzelketten (Zeichnung 3), 10 wie Kontrolle (Zeichnung 1)

Versuch 5.

13. und 17. Januar 1903. Serum Bertram. Verdünnung in Kubikcentimetern.
(Die mikroskopischen Proben sind dem Röhrechen entnommen.)

Verdünnung 7 (1 : 16 000) zeigt sich	
makroskopisch	mikroskopisch
Streptoc. I $\frac{a}{7}$ (leicht getrübt, Bodensatz)	a (keine Einzelketten)
„ V \emptyset (wie Kontrolle)	a
„ VI $\frac{a}{7}$	a
„ VIII $\frac{a}{7}$	a
„ XI \emptyset	$\frac{a}{7}$
„ XII $\frac{a}{7}$	a
„ XIV \emptyset	a
„ XV \emptyset	$\frac{a}{7}$

In den übrigen Teilen dieser Versuchsreihe waren makroskopische und mikroskopische Agglutination übereinstimmend.

Die bisherige Beschreibung der Streptokokkenagglutination bezieht sich bloß auf kurzkettige Stämme, welche in Bouillon als diffuse Trübung wachsen.

Viele Stämme wachsen aber als Bodensatz oder sedimentieren wenigstens sehr rasch, noch andere wachsen als körnige oder flockige Konglomerate, die mikroskopisch Bündel gewundener Ketten darstellen.

Die letzteren sind in dieser Form nicht zur Agglutination verwendbar, lassen sich aber meist durch geeignete Nährböden zu gleichmäßigem Wachstume benutzen (Streptococcus XIX, XXIV).

Die rasche Sedimentierung bietet für die makroskopische Agglutination große Schwierigkeit (Streptococcus V, VI), während sie die mikroskopische Methode ungehindert läßt.

Für diese sind aber die übermäßig langen Ketten ein großes Hindernis.

Wir beseitigten es dadurch, daß wir durch die Bouillonkultur¹⁾ vermittelst eines Aspirators durch mehrere Stunden Luft durchleiteten. Durch die fortwährende Erschütterung wurden die Ketten in kleine Teile von 4—6 Körnern zerrissen.

Es genügt aber auch, wenn man mittels einer Pipette mehrere Minuten lang Luft einbläst.

1) Entweder während oder nach vollendetem Wachstume.
(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Geht das Tetanolysin mit den Proteiden des Serums und des Eiklars eine ungiftige Verbindung ein?

[Aus dem Institut für experim. Therapie in Frankfurt a. M.
Direktor: Geh.-Rat Prof. Ehrlich.]

Von Dr. Paul Theodor Müller,
Privatdozent und Assistent am hygienischen Institut Graz.

Die umfangreichen hämolytischen Studien der letzten Jahre haben uns mit einer ganzen Reihe von Substanzen bekannt gemacht, welche im stande sind, die Auflösung der roten Blutkörperchen durch Blutgifte verschiedener Art und Provenienz zu verhindern. Ganz abgesehen von den durch künstliche Immunisierung mit diesen Blutgiften erzielten spezifischen Antikörpern, den eigentlichen Antihämolytinen, hat man mit normalem Blutserum gewisser Tierspecies, ferner mit pathologischen Körperflüssigkeiten, mit Exsudaten und Transsudaten derartige, nicht spezifische Hemmungswirkungen hervorrufen können, und zum Teil bereits auch einer eingehenderen Analyse unterzogen.

So haben Ehrlich und Morgenroth (1), Paul Th. Müller (2), Besredka (3) Antiambozeptoren in normalem Serum beobachtet, M. Neisser und Wechsberg (4), Paul Th. Müller (5) daselbst auch Antikomplemente nachweisen können, Befunde an welche sich naturgemäß die Beobachtung von Marshall und Morgenroth (6) angliedert, welche in einer Ascitesflüssigkeit ein sehr wirksames, aber nur auf gewisse Komplemente eingestelltes Antikomplement fanden.

Nicht geringeres Interesse als die früher genannten hemmenden Wirkungen, welche sich gegen tierische Hämolytine richten, verdient eine weitere Gruppe von Hemmungsvorgängen, bei welchen die blutlösenden Agentien, die in ihrer Wirksamkeit paralytisch werden, pflanzlicher, besonders bakterieller Natur sind. Schon in seiner ersten kurzen Mitteilung über den blutlösenden Bestandteil des Tetanusgiftes, über das Tetanolysin, hat Ehrlich (7) hervorgehoben, daß gewisse Tiersera, besonders das Pferdeserum, im stande sind, dieses Gift zu neutralisieren und die roten Blutkörperchen vor ihrer Zerstörung zu schützen. Kraus und Clairmont (8) bestätigten und erweiterten in der Folge diese Beobachtungen, indem sie zeigen konnten, daß auch andere bakterielle Hämolytine, wie die des Cholera vibrio, des Bact. coli, des Staph. pyogenes durch verschiedene Tiersera eine mehr oder minder hochgradige Hemmung erfahren, und Neisser und Wechsberg (9) konnten in ihrer interessanten Studie über das Staphylotoxin feststellen, daß dieses Gift konstant durch Pferdeserum und durch menschliches Serum in seiner Wirkung auf die roten Blutkörperchen paralytisch wird.

Welcher Art jedoch die Substanzen sind, welche diese nicht spezifischen Hemmungen bewirken, darüber war man bei dem damaligen Stande des Wissens noch völlig im unklaren, und war nicht einmal über die prinzipiell so wichtige Frage orientiert, ob es sich hierbei überhaupt um Eiweißkörper handle oder nicht.

In ganz neue Bahnen wurde nun die Forschung gelenkt durch die Beobachtung von Ransom (10), daß Cholesterin die Lösung des Blutes

durch Saponin zu verhindern vermag, und daß auch die saponin-hemmende Wirkung des normalen Blutserums auf seinem Cholesterin-gehalt beruht. Hiermit war also zum ersten Male eine chemisch genau bekannte und definierte, kristallisierbare Substanz aus dem Serum isoliert worden, welcher die Schutzwirkung zukommt, und wenn es auch nicht ohne weiteres gestattet war, die Hämolyse durch Saponin mit der durch die genannten Bakteriengifte bewirkten zu analogisieren, so bildete doch diese Entdeckung Ransoms einen mächtigen Ansporn dafür, auch bei den anderen Hemmungsvorgängen der Hämolyse nach derartigen Substanzen bekannter chemischer Konstitution zu fahnden.

Noch in anderer Richtung war jedoch die Ransom'sche Beobachtung von einigem Einfluß auf unsere Anschauungen über das Zustandekommen der in Rede stehenden Hemmungen. Meist hatte man stillschweigend vorausgesetzt, daß es sich bei denselben um ein ähnliches Verankern zweier wie Schlüssel und Schloß aufeinander passender chemischer Komplexe handle, wie man dasselbe für die Antikörper anzunehmen allen Grund hat. In dem Falle des Saponins hingegen, und der Hemmung seiner lösenden Wirkung auf die roten Blutkörperchen durch das Cholesterin des Serums, war es von vornherein einleuchtend, daß man es mit einem ganz anderen Phänomen zu tun habe, als mit einer chemischen Bindung zwischen Saponin und Cholesterin: nämlich mit einer Verteilung des Giftes zwischen zwei Lösungsmitteln, deren eines in den roten Blutkörperchen, deren anderes in dem Serum enthalten ist, und von deren relativen Mengenverhältnissen es abhängt, ob das Gift in zur Lösung ausreichender Quantität von den Erythrocyten aufgenommen wird, oder ob es der Hauptmasse nach auf das Serum beschränkt bleibt und dann natürlicherweise die Blutzellen vollkommen intakt läßt.

Hiermit war also ein zweiter Typus von entgiftenden, hemmenden Wirkungen gegeben, welchen man, einem Vorschlag von Bashford (11) folgend, als pseudo-antitoxischen den ersteren antitoxischen Phänomenen, bei welchen es zu einer wirklichen Bindung zwischen Gift und Gegengift kommt, gegenüberstellen kann. Daß nun in der Tat eine ganze Anzahl derartiger hemmender Wirkungen, die an normalem Blutserum zur Beobachtung gelangen, pseudo-antitoxischer Natur sind, hat Bashford durch eine Reihe von Experimenten und Ueberlegungen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, wahrscheinlich gemacht, und zu ähnlichen Anschauungen ist Noguchi (12) gekommen, welcher die uns hier speziell interessierende Beobachtung machte, daß neben Serum und Milch auch dem Cholesterin eine bedeutende Schutzkraft gegenüber dem Tetanolytin zukommt. Noguchi glaubt daher annehmen zu dürfen, daß auch diese lösungswidrigen Eigenschaften des Serums und der Milch auf ihren Cholesteringehalt zu beziehen seien, wenn er auch direkte Beweise für seine Vermutung nicht beibringt.

Zu einer ganz abweichenden Auffassung dieser hemmenden Wirkung des Serums auf die blutlösende Komponente des Tetanusgiftes gelangten nun Arrhenius und Madsen (13) in ihrer Arbeit, welche sich die Anwendung der physikalischen Chemie auf das Studium der Toxine und Antitoxine zum Ziele setzte. Aus gewissen quantitativen Verhältnissen, die sich bei ihren Versuchen mit Serum und mit Eiereiweiß, welches auch eine starke antihämolytische Wirkung besitzt, herausstellten, glaubten die Verfasser sich zu dem Schlusse berechtigt, daß das Gift sich mit den Proteiden zu einer weniger giftigen Modi-

fikation verbinde. „Wie wir gesehen haben“ — so schreiben die beiden Forscher (p. 33) — „verbindet sich das Tetanolytin wahrscheinlich mit den roten Blutkörperchen, und unter diesen Umständen ist es sehr wahrscheinlich, daß auch das Albumin oder Serum oder vielleicht einer seiner Bestandteile mit dem Tetanolytin zusammentritt, welches auf diese Weise abgeschwächt wird.“ „Die Zugabe von Proteïden, einschließlich des Normalserums, bewirkt also eine Herabminderung der Hämolyse. Dieselben verhalten sich so, als ob sie sich teilweise mit den Basen und mit dem Tetanolytin verbänden, wodurch schwächer wirkende hämolytische Mittel zustande kommen.“ Und etwas später: (p. 35) „Diese Versuche führen zu dem Schlusse, daß sich eine Verbindung zwischen Tetanolytin und dem Proteïd bildet, die die Eigenschaften des Tetanolytins, obgleich in geringerem Grade, bewahrt“.

Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die Existenz derartiger ungiftiger oder wenigstens weniger giftiger Verbindungen zwischen dem Tetanolytin und gewissen Proteïden von allerhöchstem theoretischen Interesse wäre, und es schien daher berechtigt, sich die Frage vorzulegen, ob sich in der Tat Beweise für oder gegen diese Annahme von Arrhenius und Madsen beibringen lassen. — Es ist klar, daß die Anschauung der genannten Forscher von dem Momente an hinfällig sein muß, wo gezeigt werden kann, daß sich die hemmende Fähigkeit des Serums und des Eiereiweißes von den Proteïden trennen läßt, und daß auch mit Eiweißfreien Extrakten dieser Substanzen die Blutkörperchen vor der zerstörenden Einwirkung des Tetanolytins geschützt werden können.

Der Weg, der beschritten werden mußte, um diese Frage zur Entscheidung zu bringen, war hiermit klar vorgezeichnet. Da, wie bereits erwähnt wurde, eine Beteiligung des Serumcholesterins an diesen Hemmungsvorgängen wenn auch nicht bewiesen, so doch durchaus nicht unwahrscheinlich war, so lag es nahe, die angestrebte Trennung der hemmenden Substanzen von den Eiweißkörpern durch Alkoholzusatz zu versuchen, welcher die letzteren zur Fällung bringt, während Cholesterin und ähnliche lipoide Substanzen in Alkohol gelöst bleiben, und nach Eindampfen zur Trockne und Aufnehmen in physiologischer Kochsalzlösung auf ihre antihämolytischen Wirkungen geprüft werden können. Als notwendige Ergänzung zu diesen Versuchen mußte dann ferner festgestellt werden, ob die mit Alkohol gefällten und nach Abpressen der Flüssigkeit wieder in Lösung gebrachten Serumeiweißkörper noch hemmende Wirkungen auf das Tetanolytin auszuüben vermögen, oder ob sie diese Fähigkeiten eingebüßt haben.

Einer der in diesem Sinne angestellten Versuche findet sich in Protokoll I ausführlich wiedergegeben. Bemerkt sie hierzu nur noch, daß die Alkoholfällung und Filtration möglichst rasch vorgenommen werden muß, damit eine Koagulation der Serumeiweißkörper tunlichst verhindert werde, und beim Wiederauflösen des Niederschlages wenn auch nicht vollkommen klare, so doch nur mäßig opalescente, im übrigen aber homogene Flüssigkeiten erzielt werden.

Versuch I.

10 ccm Normal-Pferdeserum mit etwa 5-fachem Volumen Alcohol absol. gefällt, so rasch als möglich filtriert; der Niederschlag zwischen Filtrierpapier gut abgepreßt und in 10 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung aufgelöst. Die Lösung ist opalescent.

a) 1 ccm Ochsenblut + 0,002 g Tetanolytin (= ungefähr die doppelte lösende Dosis) + steigende Mengen Normal-Pferdeserums, bezw. des gelösten Alkoholniederschlages; das Ganze auf 2,5 ccm aufgefüllt.

ccm	Normal-Pferdeserum	Alkoholfällung aus Pferdeserum, gelöst
0,1	vollkommene Lösung	} vollkommene Lösung.
0,2	mäßige Lösung	
0,3	Spur	
0,4	Spur	
0,5	0	
0,6	0	
0,7	0	
0,8	0	
0,9	0	
1,0	0	
1,1	0	
1,2	0	
1,3	0	
1,4	0	

b) Das Filtrat von dem Eiweißniederschlag des Serums wird auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, in dem ursprünglichem Volumen (= 10 ccm) Kochsalzlösung der Trockenrückstand aufgenommen und der folgende Versuch damit angestellt:

1 ccm Ochsenblut + 0,002 g Tetanolsin und steigende Mengen des Alkoholextraktes, auf 2 ccm mit physiol. Kochsalzlösung aufgefüllt:

0,02	Alkoholextrakt:	starke Lösung
0,04	"	mäßige Lösung
0,06	"	"
0,08	"	geringe Lösung
0,1	"	Spur
0,2	"	} 0
0,3	"	
0,4	"	
0,5	"	
"	"	

Die Ergebnisse dieser Versuche waren vollkommen eindeutige. Während nämlich die gefällten und wieder gelösten Eiweißkörper selbst in großen Dosen jede hemmende Wirkung vermissen ließen, war der alkoholische Extrakt des Serums mit starker antihämolytischer Kraft begabt¹⁾; mit anderen Worten: das hemmende Agens war nicht mit den Eiweißkörpern mitgefällt worden, sondern im Alkohol gelöst geblieben, war also notwendigerweise von den Serumproteiden verschieden. Die angestrebte Trennung war somit, zunächst wenigstens für das Serum, vollkommen gelungen, und eine Deutung der gedachten Hemmungsphänomene in dem Sinne von Arrhenius und Madsen dadurch unhaltbar geworden.

Auch für das Eiereiweiß läßt sich nun ein ganz ähnlicher Nachweis führen. Da sich hier einige vielleicht nicht uninteressante Besonderheiten ergaben, so sei auch auf diesen Punkt etwas näher eingegangen.

Zunächst stellte sich nämlich heraus, daß das Hühnereiweiß bei manchen meiner Versuche entweder gar keine oder doch nur sehr geringe hemmende Tätigkeit gegenüber dem Tetanolsin entfaltet, die anscheinend schwächer war, als nach den Beobachtungen von Arrhenius

1) Erwähnt sei, daß die hemmende Wirkung der Alkoholextrakte meist viel beträchtlicher war, als die des ursprünglichen Serums; eine Tatsache, die wohl dadurch ihre Erklärung findet, daß die hemmenden Substanzen — Cholesterin oder andere Lipide — im Serum nicht in freiem Zustande, sondern zum Teil in unwirksamer Form enthalten sein dürften.

und Madsen zu erwarten gewesen wäre. In anderen Fällen war allerdings die antihämolytische Wirkung etwas stärker ausgeprägt. Es kann wohl kaum einem Zweifel unterliegen, daß wir es hier mit individuellen Differenzen der untersuchten Hühnereier, vielleicht auch mit Rassenverschiedenheiten oder Verschiedenheiten der Jahreszeit, des Alters, Bebrütungsstandes etc. zu tun haben dürften. Jedenfalls aber muß hervorgehoben werden, daß schon das Bestehen derartiger bedeutenderer Differenzen sehr entschieden gegen eine entgiftende Rolle des Eiweißes an sich spricht und viel besser mit der Anwesenheit hemmender Beimengungen zu vereinen ist, welchen eine größere qualitative und quantitative Schwankungsbreite zugestanden werden kann, als den eigentlichen Eiweißkörpern des Hühnereies.

Eine meist intensivere hemmende Kraft besaß dagegen das Eiweiß der Enteneier, wengleich auch hier nicht selten erhebliche Schwankungen zu beobachten waren. In Tabelle II finden sich die bei einem derartigen vergleichenden Versuche erhaltenen Ergebnisse verzeichnet. Zur besseren Orientierung wurde gleichzeitig auch ein Versuch mit Pferdeserum unter genau denselben Modalitäten angestellt.

Versuch II.

Je 2 ccm Ochsenblut werden mit dem in der ersten Spalte verzeichneten Mengen Tetanolyisin versetzt, dann die in der 2. Spalte stehenden Mengen der hemmenden Substanzen (Normal-Pferdeserum, Hühnereiweiß 50 Proz. und Enteneiweiß 50 Proz.) hinzugefügt, und das Ganze auf 5 ccm mit physiolog. Kochsalzlösung aufgefüllt.

Tetano- lysin	Menge der hemmenden Substanz	Normal- Pferdeserum	Hühnereiweiß 50 Proz.	Enteneiweiß 50 Proz.
0,002	0,5	Spur	vollkommen	vollkommen
	1,0	0	"	mäßig
	1,5	0	"	Spur
	2,0	0	"	Spur
	2,5	0	fast vollkommen	0
	3,0	0	" "	0
	0	vollkommen	vollkommen	vollkommen
0,0015	0,5	Spürchen	"	starke Lösung
	1,0	0	"	mäßige "
	1,5	0	"	Spur
	2,0	0	fast vollkommen	"
	2,5	0	sehr stark	0
	3,0	0	" "	0
	0	vollkommen	vollkommen	vollkommen
0,001	0,5	0	"	stark
	1,0	0	fast vollkommen	mäßig
	1,5	0	sehr stark	Spur
	2,0	0	stark	0
	2,5	0	mäßig	0
	3,0	0	gering	0
	0	fast vollk.	fast vollkommen	fast vollkommen
0,0005	0,5	0	mäßig	geringe Lösung
	1,0	0	gering	0
	1,5	0	Spur	0
	2,0	0	"	0
	2,5	0	" 0	0
	3,0	0	0	0
	0	mäßige Lös.	mäßige Lösung	mäßige Lösung

Bezüglich der Technik dieser Experimente sei nur noch angeführt, daß das Eiereiweiß stets mit dem gleichen Volumen physiologischer Koch-

salzlösung versetzt und kräftig durchgeschüttelt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung zu erzielen. Da ferner neben den komplett lösenden Tetanolytismengen auch geringere Quantitäten in Anwendung kamen, bei welchen die Hemmung markanter hervortritt, und da hierbei etwas größere Flüssigkeitsschichten zur leichteren Beurteilung des Lösungsgrades erwünscht erscheinen, so wurden stets 2 ccm Blutaufschwemmung mit steigenden Mengen des Eiereiweißes versetzt und, nach Hinzufügung der betreffenden Giftdosis, auf 5 ccm aufgefüllt.

Ist nun auch die hemmende Substanz des Enten- und Hühner-eiweißes, wie die des Pferdeserums, mit Alkohol extrahierbar? Die folgenden Versuche geben darüber Aufschluß (Versuch III).

Versuch III.

Je 25 ccm 50-proz. Enten- und Hühner-eiweiß mit 5-fachem Volumen Alcohol absol. gefällt. Der Alkohol des Extraktes verjagt und der Trockenrückstand in physiol. Kochsalzlösung (25 ccm) gelöst.

Bemerkt sei, daß das zu diesem Versuche dienende Hühner- und Enteneiweiß besonders starke hemmende Kraft besaß, und daher für unsere Zwecke sehr geeignet war.

Je 2 ccm Ochsenblut + 0,002 Tetanolytin + steigende Mengen der alkoholischen Extrakte; auf 5 ccm ergänzt.

ccm	Enteneiweiß, alkoh. Extr.	Hühner-eiweiß, alkoh. Extr.
0,1	Spur von Lösung	geringe Lösung
0,3	Spur	Spur
0,5	"	"
1,0	" 0	"
1,5	0	0
2,0	0	0
2,5	0	0
3,0	0	0
3,5	0	0
0	vollkommene Lösung	vollkommene Lösung

Wie man aus dieser Zusammenstellung entnehmen kann, ist in der Tat die hemmende Substanz des Enten- und Hühner-eiweißes in den alkoholischen Extrakt übergegangen, und verhält sich somit genau so, wie die lösungswidrigen Stoffe des Pferdeserums. Wir können daher auch für das Eiereiweiß eine direkte, das Tetanusgift modifizierende oder abschwächende Wirkung der Proteinstoffe als ausgeschlossen betrachten und sehen uns gezwungen, die antihämolytische Wirkung desselben auf eine alkohol-lösliche Beimengung zu beziehen, die mit allerhöchster Wahrscheinlichkeit als Cholesterin angesprochen werden kann, da dem Lecithin nach den Untersuchungen Noguchis diese Fähigkeit nicht innewohnt.

Wenn wir nun weiter bedenken, daß eine chemische Bindung zwischen Tetanolytin und Cholesterin als im höchsten Grade unwahrscheinlich bezeichnet werden muß, so kommen wir schließlich zu der Auffassung, die schon Bashford vertreten hat, und nach welcher wir in der durch Serum und Eiereiweiß bedingten Hemmung der Hämolyse nicht ein echtes antitoxisches Phänomen mit Bindung zwischen Giften und Gegengiften zu sehen haben, sondern ein pseudoantitoxisches, bei welchem die schützende Wirkung auf anderem Wege — vermutlich durch physikalisch-chemische Lösungs- und Verteilungsvorgänge — zu stande kommt.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Geh.-R. Prof. Ehrlich für die in so reichem Maße be-

wiesene Gastfreundschaft in seinem Institute meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenso bin ich seinen Assistenten, Herrn Dr. Morgenroth, Mitglied des Instituts und Herrn Dr. Sachs wegen ihres liebenswürdigen Entgegenkommens zu bestem Danke verpflichtet.

Literatur.

- 1) Berl. klin. Wochenschr. 1901.
- 2) Centralbl. für Bakt. Bd. XXIX. 1901.
- 3) Annal. de l'inst. Pasteur. T. XV, 1901.
- 4) Münch. med. Wochenschr. 1901.
- 5) Centralbl. f. Bakt. Bd. XXIX. 1901.
- 6) Centralbl. f. Bakt. Bd. XXXI. 1902.
- 7) Ges. der Charitéärzte, 3. Febr. 1898; Berlin. klin. Wochenschr. 1898. No. 12.
- 8) Wiener klin. Wochenschr. 1900 und 1901.
- 9) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI. 1901.
- 10) Deutsche med. Wochenschr. 1901.
- 11) Journal of Pathology. 1902.
- 12) Centralbl. f. Bakt. Bd. XXXII. 1902.

Nachdruck verboten.

Zur Frage des Pankreas-Cytolysins.

Eine kritische Bemerkung von Dr. Ernst Sauerbeck, Basel,
gewes. I. Assistent am path. Institut.

Nach einer Reihe tastender Versuche (Grohmann 1884, Fodor 1887) war die Lehre von der Wechselwirkung zwischen infektiösem Mikroorganismus und infiziertem Tier zunächst durch die Untersuchungen der Flüggeschen Schule und Buchners, besonders aber durch die Cholerastudien R. Pfeiffers und die anschließenden Forschungen Metschnikoffs und Bordets zu einem jener Kapitel der Pathologie geworden, die versprachen, weit über den Kreis der Spezialwissenschaft hinaus für die gesamte Biologie von fundamentaler Bedeutung zu werden.

Die Entdeckung von Belfanti und Carbone¹⁾ (1898) betreffend das Verhalten höherer Organismen gegenüber der Einverleibung fremden Blutes (welches Verhalten übrigens wegen der praktischen Bedeutung des Eingriffs bis zu einem gewissen Grade schon längere Zeit bekannt war [vergl. Creite²⁾ und Landois³⁾⁴⁾ mit seiner Sensibilisierungstheorie, andererseits Ehrlich⁵⁾ (in Kollaboration größtenteils von Morgenroth) durch Subsumption der betreffenden Erscheinungen unter seine Seitenkettentheorie gab, zur Grundlage eines theoretischen Lehrgebäudes, das die Reaktion des lebenden Körpers gegen Bakterien nur als Spezialfall der Fähigkeit des höheren Organismus erkennen ließ, auf Einverleibung fremder, ja sogar,

1) Belfanti und Carbone, Giornale della Regia Accad. di med. di Torino. 1898. p. 321.

2) Criste, Zeitschrift f. rat. Med. Bd. XXXVI.

3) Landois, Zur Lehre von der Bluttransfusion. Leipzig 1875.

4) Siehe die letzten Bände der Annales de l'Institut Pasteur, insbesondere Ann. Pasteur. T. XIV. 1900. p. 256.

5) Siehe Berliner klin. Woch. 1899. p. 6 u. 481; 1900. p. 453 u. 681.

wie sich herausstellte, auch eigenen lebenden oder toten Protoplasmas, sowie von dessen Derivaten, mit bestimmten Stoffwechselfvorgängen zu reagieren, die alle die Tendenz zeigen, die schädlichen Einwirkungen, die aus diesen Einverleibungen erwachsen können, zu neutralisieren.

Wir haben hier nicht die Absicht, über diese interessante Epoche der modernen Immunitätslehre uns weiter zu verbreiten, es ist dies in letzter Zeit wiederholt von berufener Seite geschehen¹⁾.

Auch die Würdigung der praktischen Bedeutung, die diese Entdeckungen für physiologische und pathologische Chemie und für die forense Medizin durch Schaffung der vitalen Differentialdiagnostik erhielten²⁾, liegt uns fern.

Wir möchten hier nur eine kurze kritische Bemerkung zu einer kleinen Gruppe jener Arbeiten geben, die sich mit dem Effekt der Injektion von Organemulsionen in artfremde oder artgleiche Tiere beschäftigen.

Bald nachdem Bordet sich dem systematischen Studium von Blutinjektionen zugewandt hatte, wurden bekanntlich andere Zellelemente denselben Versuchen unterworfen, zunächst, aus bestimmten theoretischen Erwägungen heraus, Spermatozoen, dann Leukocyten, die ja ebenfalls eine gewisse Sonderstellung in histiophysiologischer Beziehung einnehmen, bald auch eine ganze Reihe anderer parenchymatöser Zellen: Leber-, Nieren-, Nervenzellen³⁾.

Wenn auch die Resultate eine völlige Uebereinstimmung bisher nirgends ergaben, so schien doch in der Injektion einer bestimmten Zellart ein Mittel gegeben zu sein, im Serum des behandelten Tieres ein Gift gegen die injizierte Zellart zu bekommen (Cytolysin), dessen Wirkung in Herabsetzung der Vitalität oder gar Auflösung der betreffenden Zellen sich äußert. Und die Möglichkeit, durch solche Gifte im Organismus ohne anderweitige (traumatische etc.) Störung Gruppen von bestimmten Zellen auszuschalten, eröffnete der normalen, insbesondere aber der pathologischen Physiologie Perspektiven, die es begreiflich erscheinen lassen, daß diesen Untersuchungen eine immer wachsende Zahl von Forschern sich zuwendet.

So hat man gehofft, in eine Reihe von noch dunklen Krankheiten durch Einführung der „cytolytischen“ Methode Einsicht zu gewinnen, so bezüglich der Myxödems, der Eklampsie, neuerdings des Diabetes.

Auf Arbeiten, die den letzteren betreffen, sollen unsere angekündigten kritischen Bemerkungen sich beziehen.

Zwei französische (bzw. belgische) Autoren Bierry⁴⁾ und Surmont⁵⁾ haben mit Pankreasctolysin experimentiert. Die Resultate waren, wie bei allen ähnlichen Arbeiten, nicht ganz unzweideutige.

1) London, Centralblatt für Bakt. Abt. I. Bd. XXXII. 1902. No. 1 u. 2. p. 48 u. 147. Piorkowski, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXXI. 1902. No. 18. p. 553. Aschoff, Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. I. und Separat bei G. Fischer, Jena 1902. Silberschmidt, Korrespondenzblatt für Schweizer Aerzte. 1902. p. 289 u. a.

2) Deutsch u. a. (Lit. siehe z. B. London, l. c.).

3) Eine Uebersicht dieser Arbeiten, soweit sie uns bekannt geworden, geben wir, mit Rücksicht auf die Organe geordnet, am Schluß der Arbeit, indem wir manchem Leser damit einen Dienst zu erweisen hoffen.

4) Bierry, Recherches sur les injections de sang et de sérum cytolytique au chien. (Compt. rend. hebdom. de la soc. de biologie de Paris. T. LIII. 1901. p. 839. Sitzung vom 27. Juli.)

5) Surmont, Sur la préparation d'un cytotoxine pancréatique. (La presse médicale. 1901. No. 35. p. 177 [aus der Société de Biologie vom 27. April 1901]).

Wir sehen hier auch von dem Resultat ab, wenden uns vielmehr gegen die Voraussetzung, die den Schlüssen in beiden Arbeiten zu Grunde liegen. Die Autoren haben, um die Schädigung des Pankreas durch die injizierten Cytolysine zu bestimmen, den Urin auf Zucker untersucht. Sie stehen damit augenscheinlich auf dem Standpunkt, daß das gewöhnliche sekretorische Parenchym des Pankreas auch der Verarbeitung des Zuckers diene. Nun hat aber eine stattliche Zahl von Arbeiten¹⁾ die Vermutung, die schon am Anfang des verflossenen Jahrzehnts²⁾ aufgetaucht war, sehr wahrscheinlich gemacht, daß nämlich diese Funktion nicht dem gewöhnlichen Parenchym, sondern den in ihm zerstreuten sog. Langerhansschen Inseln zukomme. Hansemann hat zwar auf der Pathologerversammlung in Hamburg im Oktober 1901 (Literaturverzeichnis B No. 7) den Versuch gemacht, die Hoffnung, durch diese neue Annahme die Daten der Klinik und der pathologischen Anatomie in Uebereinstimmung zu bringen, als illusorisch hinstellen. Die seither publizierten, zum Teil sehr ausführlichen und gründlichen Untersuchungen, besonders auch die Experimente von W. Schulze (Literaturverzeichnis B No. 2) und Ssobolew (Literaturverzeichnis B No. 11)³⁾ lassen aber kaum einen Zweifel bestehen, daß in der angedeuteten Richtung des Rätsels Lösung liegt⁴⁾. Die Wahrscheinlichkeit, daß es tatsächlich die Langerhansschen Inseln sind, die durch innere Sekretion eines Fermentes oder wie immer die Zerlegung des Zuckers besorgen, ist jedenfalls groß genug, um für Versuche über Physiologie und Pathologie des Pankreas in Rechnung zu kommen.

Die Resultate, die durch die oben zitierten Arbeiten über Cytolysine des Pankreas bis jetzt gezeitigt worden sind, würden, wenn sie sich bestätigen, einen neuen Beweis, bis zu einem gewissen Grade wenigstens, für die „Inseltheorie“ ergeben. Es hat sich nämlich trotz relativ schwerer Schädigung des gewöhnlichen Pankreasparenchyms infolge der Cytolysininjektion kein Diabetes, sondern nur vorübergehende unbedeutende Störung in dieser Hinsicht eingestellt.

Nun sind ja allerdings bei Herstellung des Cytolysins die Inseln mit dem gewöhnlichen Parenchym zur Verarbeitung gekommen; und man könnte daher auch die Bildung eines Antikörpers gegen die Inseln und folglich eine Schädigung der Inseln bei der Probeinjektion erwarten, die den Schluß der Versuchsreihe bildet.

In den erwähnten Arbeiten ist von einer solchen Störung nichts zu lesen; es finden aber in denselben die Inseln überhaupt keine Berücksichtigung, wohl, da den Autoren die Fragestellung unbekannt geblieben ist, die, wie oben skizziert, auf diese Gebilde neuerdings die Aufmerksamkeit gezogen hat.

Es darf aber folgendes nicht vergessen werden: Wenn die Inseln auch mit dem übrigen Parenchym zur Injektion gelangen, so bleiben sie dabei wegen ihrer relativ sehr kleinen Masse diesem anderen Zell-

1) Literaturverzeichnis B.

2) Laguesse, Société de biologie. T. XXIX. Paris 1893. p. 819 (29. Juli) und später Journal de l'Anat. et Phys. T. XXXII. 1496. p. 241 ff.

3) Hansemann hat die Resultate von Schulze auf Grund eigener Versuche mit anderem Resultat geglaubt entwerten zu können. Schulzes Versuche sind aber so klar in ihrem ganzen Verlauf geschildert, außerdem durch Ssobolew so glänzend bestätigt worden, daß Hansemanns Einwände vorläufig nicht entscheidend sein dürften.

4) Ueber eigene Untersuchungen werden wir demnächst an anderem Ort ausführlich berichten.

material gegenüber an Wirksamkeit doch wohl sehr zurück; daß ein Cytolysin gegen sie in irgend erheblicher Menge erzeugt wird, muß als durchaus unwahrscheinlich bezeichnet werden. Und es wäre somit das negative Resultat bezüglich der Zuckerausscheidung mit der Theorie völlig im Einklang.

Wir haben durch die Versuche von Schulze in der Unterbindung des Ausführungsganges des Pankreas ein Mittel kennen gelernt, uns ein Pankreas zu verschaffen, in dem alles sekretorische Parenchym verschwindet und nur die Inseln sich erhalten.

Vielleicht gelingt es mit Verwertung dieser Tatsache durch die Methodik, wie sie die Erforschung der Cytolysine gezeitigt hat, ein einwandfreies Resultat zu erreichen, das mit dazu verwendet werden kann, die Bedeutung der Langerhansschen Inseln endgültig klarzustellen und zugleich den langjährigen Streit über den „Pankreasdiabetes“ beizulegen.

Nachschrift.

Nach Abschluß des Manuskriptes ist uns eine Arbeit von Herxheimer (Literaturverzeichnis B No. 14) in die Hände gekommen, die ebenfalls die Veränderungen der Langerhansschen Inseln behandelt.

Es gereicht uns zur Genugtuung, zu sehen, daß auch Herxheimer bei aller Objektivität gegenüber dem wechselvollen pathologisch-anatomischen Bilde an der Inseltheorie nicht irre wird, hauptsächlich auf die erwähnten Experimente sich stützend. Insbesondere aber muß hier Erwähnung finden, daß auch Herxheimer die Hoffnung ausspricht, daß die Frage, wie wir dies oben auseinandersetzen, von Seite der Forschung über Cytolyse wesentliche Förderung erfahren könnte.

Literaturverzeichnis A.

Cytolysine (ausschließlich Hämolysine).

(Nach Organen und, innerhalb der einzelnen Abschnitte, chronologisch geordnet.)

Cytolysine (Metschnikoff) gegen

I. Leukocyten.

- 1899 1) Metschnikoff, Ann. Pasteur. T. XIII. 1899. No. 10. p. 737.
 1900 2) Funk, Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVII. 1900. p. 670.
 1901 3) Gladin (russisch), Bolnitschnaja Gazeta Botkina. 1901. No. 33. p. 137.

II. Spermatozoen.

- 1900 4) Metschnikoff, Ann. Pasteur. T. XIV. 1900. No. 6. p. 369.
 5) Metalnikoff, Ann. Pasteur. T. XIV. 1900. No. 9. p. 577.
 6) Moxter, Deutsche med. Wochenschr. 1900. No. 4. p. 62.
 1901 7) Weichardt, Ann. Pasteur. T. XV. 1901. p. 833.
 1902 8) Salvioli, Gazette degli ospedali e delle cliniche. 1902. No. 4. p. 28. (Vorläufige Mitteilung.)
 9) London, Arch. des sciences biolog. (russ.). 1902. (2 Mitteilungen.)

III. Ovarialsubstanz.

- 1902 10) Ceconi e Robecchi, Riforma med. 1902. No. 65 u. 66.

IV. Nervensubstanz.

- 1899 11) Pitfield, Lancet. 1899. p. 718.
 1900 12) Centanni, Riforma med. T. IV. 1900. p. 374.
 13) Delezenne, Ann. Pasteur. T. XIV. 1900. p. 686.
 1902 14) Ravenna, Riforma med. Vol. II. 1902. p. 422.

V. Oberflächenepithel.

- 1899 15) v. Dungern, Münch. med. Woch.. 1899. No. 38. p. 1228. (Flimmerepithel der Trachea.)

VI. Nieren.

- 1900 16) Lindemann, Ann. Pasteur. 1900. No. 2. p. 49.
 17) Delezenne, Ann. Pasteur. 1900. No. 10. p. 686.
 18) Schütze, Deutsche med. Woch. 1900. No. 27.
 1901 19) Nefedieff, Ann. Pasteur. 1901. No. 1. p. 17.
 20) Bierry, Compt. rend. des séances de l'Acad. des Scienc. (Paris). 1901. 6. Mai.
 — Compt. rend. hebdom. de la Soc. de Biol. (Paris). 1901. 27. Juli.
 21) Ascoli u. Figuri, Berliner klin. Woch. 1902. No. 24. p. 560.
 22) Castaigne u. Rathezy, Compt. rend. de la Soc. de Biol. (Paris). 1902.
 No. 17. p. 563.

VII. Leber.

- 1900 23) Delezenne, Compt. rend. de l'Acad. des Scienc. (Paris). 1901. 6. Mai.
 24) Schütze, Deutsche med. Woch. 1900. No. 27.
 1901 25) Deutsch, Centralbl. f. Bakt. 1901. p. 661.

VIII. Pankreas.

- 1901 26) Surmont, La presse médicale. 1901. No. 35. p. 177. Société de Biol. Paris.
 27. avril. 1901.)
 27) Bierry, Compt. rend. hebdom. de la Soc. de Biol. (Paris). 1901. 27. juillet.
 p. 839.

IX. Nebennieren.

- 1901 28) Bigard u. Bernard, Compt. rend. Soc. Biol. 1901. No. 7. p. 161; La presse
 médicale. 1901. No. 15. p. 76.

X. Schilddrüse.

- 1902 29) Goutscharukow, Centralbl. f. Pathol. Bd. XIII. 1902. No. 4. p. 121.

XI. Placenta.

- 1902 30) Weichardt, Experimentelle Studien über die Eklampsie. (Deutsche med.
 Woch. 1902. No. 35. p. 624.)

Literaturverzeichnis B.**Pankreas (Langerhanssche Inseln) und Diabetes mellitus:**

(Chronologisch.)

- 1895 1) Dieckhoff, Beiträge zur pathologischen Anatomie des Pankreas. Festschrift
 für Thierfelder. Leipzig (Langkammer) 1895. (Ausführl. Arbeit.)
 1a) Ssobolew, Centralblatt f. allg. Path. u. path. Anat. Bd. XI. 1900. p. 202.
 (Vorl. Mitteil.)
 1900 2) Schulze, Walter, Die Bedeutung der Langerhansschen Inseln im Pan-
 kreas. (Arch. f. mikr. Anat. Bd. LVI. 1900. p. 491.)
 3) Opie, On the histology of the islands of Langerhans of the pancreas. (Johns
 Hopkins Hospital Bulletin. 1900. No. 114. p. 205—209.)
 1901 4) — —, On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of
 Langerhans and to Diabetes mellitus. (Journ. of exper. medicin. Vol. V. 1901.
 p. 398—428.)
 5) — —, Relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas. Hyaline de-
 generation of the Islands of Langerhans. (Journ. of exper. med. Vol. V. 1901.
 No. 1. p. 527—540.)
 6) Weichselbaum u. Stangl, Zur Kenntnis der feineren Veränderungen des
 Pankreas bei Diabetes mellitus. (Wiener klin. Woch. 1901. No. 41.)
 7) Hansemann, Ueber die Struktur und den Wert der Gefäßinseln des Pan-
 kreas. (Verhandlungen der Deutschen pathol. Gesellsch. in Hamburg. 1901.
 p. 187.)
 8) Wright u. Joslin, Journ. of med. research. Vol. VI. 1901. p. 360.
 9) Weichselbaum u. Stangl, Weitere histologische Untersuchungen des Pan-
 kreas bei Diabetes mellitus. (Wiener klin. Woch. 1902. No. 38. p. 969—977.)
 1902 10) Schmidt, M. B., Ueber die Beziehung der Langerhansschen Inseln des Pan-
 kreas zum Diabetes mellitus. (Münch. med. Woch. Jahrg. XLIX. 1902. No. 2.
 p. 51.)
 11) Ssobolew, Zur normalen und pathologischen Morphologie der inneren Sekre-
 tion der Bauchspeicheldrüse. [Die Bedeutung der Langerhansschen Inseln.]
 (Virch. Arch. Bd. CLXVIII. 1902. p. 91—127. [Ausführliche Arbeit.])
 12) Herzog, Zur Histopathologie des Pankreas beim Diabetes mellitus. (Virch.
 Arch. Bd. CLXVIII. 1902. p. 83—91.)

- 1903 13) Joneway u. Oertel, Bemerkung zur Pathologie der Zuckerharnruhr. (Virch. Arch. Bd. CLXXI. 1903. p. 547. [1 Fall, negativ.]
 14) Herxheimer, Zur Frage des Verhaltens der Langerhansschen Zellinseln im Pankreas bei Diabetes mellitus. Festschrift für Orth. Berlin (Hirschwald) 1903. p. 38.
 15) Fischer, Bernhard, Ueber Lipämie und Cholesterämie, sowie Veränderung des Pankreas und der Leber bei Diabetes mellitus. (Virch. Arch. Bd. CLXXII. 1903. p. 30.)

Alphabetisches Verzeichnis der im Text oder Literaturverzeichnis genannten Autoren.

- | | |
|---------------------------------|--|
| Aschoff: Text. | Landois: Text. |
| Ascoli (u. Figuri): A 21. | Lindsteiner: Text. |
| Belfanti (u. Carbone): Text. | Lindemann: A 16. |
| Bernard (Bigart u. B.): A 28. | London: A 9, Text. |
| Bierry: A 20, 27. | Metchnikoff: A 5. |
| Bigart (B. u. Bernard) A 28. | Metchnikoff: A 1, 4. Text. |
| Bordet: Text. | Morgenroth (Ehrlich u. M.): Text. |
| Buchner: Text. | Moxter: A 6. |
| Carbone (Belfanti u. C.): Text. | Nefedieff: A 19. |
| Castaigne (u. Rathezy): A 22. | Oertel (Joneway u. O.): B 13. |
| Ceconi (u. Rotecchi): A 10. | Opie: B 3, 4, 5. |
| Centanni: A 12. | Pfeiffer, R.: Text. |
| Creite: Text. | Piorkowski: Text. |
| Delezenne: A 13, 17, 23. | Pitfield: A 11. |
| Deutsch: A 25, Text. | Rathezy (Castaigne u. R.): A 22. |
| Dieckhoff: B 1. | Ravenna: A 14. |
| Dungern, v.: A 15, Text. | Robecchi (Ceconi u. R.): A 10. |
| Ehrlich: Text. | Salvioli: A 8. |
| Figuri (Ascoli u. F.): A 21. | Schmidt, M. B.: B 10. |
| Fischer, B.: B 15. | Schütze: A 18, 24. |
| Flügge: Text. | Schulze, W.: B 2. |
| Fodor: Text. | Silberschmidt: Text. |
| Funk: A 2. | Ssobolew: B 11. |
| Gladin: A 3. | Stangl (Weichselbaum u. St.):
B 6, 9. |
| Gontscharukow: A 29. | Surmont: A 26. |
| Grohmann: Text. | Weichardt: A 7, 30. |
| Hansemann: B 7, Text. | Weichselbaum (W. u. Stangl):
B 6, 9. |
| Herxheimer: B 14, Text. | Wright (W. u. Joslin): B 8. |
| Herzog: B 12. | |
| Joneway (J. u. Oertel): B 13. | |
| Joslin (Wright u. J.): B 8. | |

Nachdruck verboten.

Naphtolblau als Reagens auf Bakterienfett.

Von Professor Dr. Arthur Meyer, Marburg.

Die in dem Cytoplasma der Bakterien vorkommenden körnigen oder tröpfchenförmigen Gebilde habe ich, entsprechend ihren verschiedenen, meist sehr charakteristischen Reaktionen, in Zellkern, Volutin, Fett, Glykogen und Jogen eingeteilt. Die hauptsächlichsten Methoden zum sicheren Nachweis der zuletzt genannten, auch welche für die Erkennung der Bakterien-species recht wichtigen vier Körperklassen habe ich in meinem „Praktikum der botanischen Bakterienkunde“ (Jena, Fischer, 1903) nochmals zusammengestellt. Dort ist auch die wichtigste hierher gehörige Literatur zu finden.

Die Herren A. Dietrich und G. Liebermeister teilten nun in dieser Zeitschrift (I. Abt. Originale. Bd. XXXII. 1902. p. 858) eine Be-

obachtung über die Färbung von Einschlüssen des Milzbrandbakteriums durch Naphtolblau mit. Aus den Angaben der Autoren schien mir ziemlich sicher hervorzugehen, daß die von ihnen gefärbten „Granula“ Fetttröpfchen waren, doch blieb es mir zweifelhaft, ob nicht doch auch Volutin durch den Farbstoff gebläut werden könne.

Leicht kann man sich nun zuerst davon überzeugen, daß der bei dem von den Autoren angewandten Verfahren unter dem Einflusse des Sauerstoffs der Luft entstehende, in Wasser anscheinend nur schwierig und nur kurz nach seiner Bildung etwas reichlicher lösliche Farbstoff von dem Bakterienfette sofort aufgenommen wird, dieses intensiv färbend. Man braucht für den Färbeversuch nur Bakterien-species zu verwenden, deren genaue Untersuchung gezeigt hat, daß sie reichlich Fett, aber niemals Volutin führen. Ich verrührte ein Tröpfchen einer filtrierten 1-proz. Lösung von Dimethylparamethylendiamin (Base) auf dem Objektträger mit einer Spur der Kolonie von *Bacillus megaterium* Heintze und fügte einige Oesen voll einer Lösung von α -Naphtol in 1-proz. Sodalösung hinzu. Nach einigen Minuten färbte sich das Gemisch sehr schwach bläulich und als ich, nach Auflegen eines Deckglases, beobachtete, fand ich die Fetttropfen tief blau gefärbt. Die Färbung verschwand, als ich dem Präparate 1-proz. Schwefelsäure zusetzte.

Wären die Lösungen der Base und des α -Naphtols haltbarer, so hätten wir in dem Naphtolblau ein ausgezeichnetes Fettreagens vor uns; denn obgleich die beiden Fettfarbstoffe Sudan und „Gelb“ bei richtiger Anwendung, in übersättigter Lösung, intensiv rot oder gelb färben, ist doch die Intensität der blauen Naphtolblaufärbung eine viel größere. So leistet auch das Naphtolblau bei dicken Pilzhyphen für den Fettnachweis erheblich mehr als Sudan und ebenso zum Nachweis von Suberinlamellen in Pflanzenzellen. Selbstverständlich färben sich auch sehr kleine Tröpfchen von Olivenöl sehr intensiv in dem Naphtolblau-Reagens.

Zur Entscheidung der Frage, ob der blaue Farbstoff auch vom Volutin aufgenommen werde, habe ich den fettfreien und Volutin enthaltenden *Bacillus alvei* benutzt. Ich strich die Bakterien auf ein Deckglas aus, trocknete, fixierte und bedeckte die Materialseite des Deckglases einige Zeit mit dem Reagenzgemisch. Nach dem Abspülen der Farbflüssigkeit mit Wasser legte ich das Deckglas auf einen Objektträger und beobachtete. Das Volutin war ungefärbt. Ich ließ hierauf Methylenblau (1 + 10) unter das Deckglas fließen, bis die Bakterien tief blau gefärbt waren, saugte dann die Farblösung ab und setzte 1-proz. Schwefelsäure hinzu. Jetzt traten die Volutinmassen blau gefärbt hervor. Volutin wird also durch das Naphtolblau nicht gefärbt.

Ueber das Volutin möchte ich schließlich noch sagen, daß es, ebenso wenig wie die zur Gruppe der Fette gehörenden Einschlüsse des Cytoplasmas der Bakterien, ein den Bakterien eigentümlicher Stoff ist. Ich habe bis jetzt Stoffe, welche durchaus alle charakteristischen Reaktionen des Bakterienvolutins zeigen, nachweisen können bei verschiedenen Ordnungen der Pilze, bei den Florideen, Cyanophyceen, Diatomeen und Chlorophyceen. Für einige andere Pflanzengruppen, die Volutin zu besitzen scheinen, habe ich die mikrochemische Untersuchung noch nicht genügend eingehend durchgeführt. Dabei ist zu bemerken, daß auch die Form des Auftretens und der Ort der Ablagerung in der Zelle überall gleich ist.

Nachdruck verboten.

Weiteres zur kulturellen Differenzierung der Ruhrbacillen gegenüber ruhrähnlichen Bakterien.

[Aus dem Kgl. Institut für Infektionskrankheiten zu Berlin (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. R. Koch).]

Von Stabsarzt Dr. H. Hetsch, kommandiert zum Institut.

Die kulturellen und biologischen Unterscheidungsmerkmale der Ruhrbacillen gegenüber den ruhrähnlichen Bakterien sind teilweise so geringfügige, daß die Stellung einer sicheren Differentialdiagnose durch die Kultur in vielen Fällen mit großen Schwierigkeiten verknüpft ist. Nicht nur die allgemein gebräuchlichen Nährböden lassen hier im Stich, auch der Lackmus-Laktose-Agar und die Lackmusmolke bieten nicht gegenüber allen ruhrähnlichen Bakterien in die Augen fallende Unterscheidungsmerkmale, besonders nicht nach 24-stündigem Wachstum der Kulturen. Der einzige Nährboden, welcher sich in dieser Beziehung bisher als verlässlich erwiesen hat, ist der von Lentz¹⁾ angegebene Lackmus-Mannit-Agar. Jedoch auch in diesem ist bei der Mehrzahl der ruhrähnlichen Bakterien, wie z. B. bei den Stämmen „Pseudodysenterie I und II“, die Entscheidung erst nach 48-stündigem Wachstum der Stichkulturen möglich.

In der Erwägung, daß der Grund hierfür in der Konsistenz des Nährbodens liege, habe ich versucht, durch Modifizierung der ursprünglich von Barsiekow²⁾ zur Unterscheidung des Typhusbacillus vom *Bacterium coli commune* angegebenen flüssigen Lackmus-Nutrose-Nährmedien und unter Benutzung der von Klopstock³⁾ empfohlenen Abänderungen derselben einen Nährboden herzustellen, der möglichst schon nach 24 Stunden eine sichere Differentialdiagnose des Ruhrbacillus und der ihm ähnlichen Bakterien ermöglicht. Angeregt durch die guten Erfahrungen, die mit Mannit und Maltose als Zusatz zu Dysenterienährböden gemacht wurden, habe ich ebenfalls diese beiden Kohlehydrate an Stelle von Milchzucker und Traubenzucker zu der Lackmus-Nutrose-Lösung zugesetzt und dann durch Variieren des Lackmus- und Zuckergehaltes ausprobiert, wie der Nährboden zusammengesetzt sein muß, um den an ihn gestellten Anforderungen nach Möglichkeit zu genügen.

Am besten bewährte sich mir für den Mannitnährboden ein Gehalt an 1 Proz. Nutrose, 0,5 Proz. Kochsalz, 5 Proz. Lackmuslösung (nach Kahlbaum) und 2 Proz. Mannit, während für den Maltosenährboden ein Maltosegehalt von 2,5 Proz. die besten Resultate lieferte, bei sonst analoger Zusammensetzung.

Die Herstellung der Nährböden geschieht folgendermaßen: 10 g Nutrose werden mit 5 g Kochsalz und 1 l Aqua destillata zusammen 2 Stunden gekocht. Des weiteren werden 50 g Lackmuslösung zusammen mit 20 g Mannit (bzw. 25 g Maltose) 10 Minuten lang gekocht. Nachdem beide Lösungen auf ca. 50° abgekühlt sind, werden

1) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLI. p. 559 ff.

2) Wiener klin. Rundschau. 1901. No. 44.

3) Berliner klin. Wochenschr. 1902. p. 803 ff.

sie miteinander gut gemischt und in sterile Reagenzgläser gefüllt, welche sogleich noch einmal $\frac{1}{4}$ Stunde lang im Dampftopf sterilisiert werden. Eine längere Sterilisierung ist unnötig, da die angegebene Dauer erfahrungsgemäß genügt, ja sie ist sogar schädlich, da bei längerem Erhitzen zu große Kohlehydratmengen zersetzt werden und dadurch die Brauchbarkeit der Kulturflüssigkeit vermindert wird. Der Mannit-Nutrose-Nährboden hat eine bläulich-violette Farbe, während das Maltose-Nutrose-Gemisch einen mehr rotvioletten Farbenton zeigt. Die Nährböden sind in völlig sterilem Zustande lange Zeit haltbar, eine geringe Kaseinabscheidung aus der Nutrose setzt die Brauchbarkeit nicht herab.

Zum Zwecke differentialdiagnostischer Untersuchungen wird die Nährflüssigkeit nach Beimpfung in sterile Gärungskölbchen gefüllt und man kann dann nach 24-stündigem Verweilen im Brütschranke an den Kulturen beobachten, 1) ob die eingesäte Bakterienart Säure bzw. Alkali gebildet hat oder ob sie die Farbe des Nährbodens unverändert gelassen hat, 2) ob sie das Kasein der Nutrose zur Koagulation gebracht und 3) ob sie Gas gebildet hat. Um ersteres festzustellen, muß man natürlich stets ein unbeimpftes Kontrollkölbchen zum Vergleich heranziehen.

Ich habe in beiden Nährböden sämtliche echten Ruhrstämmen und ruhrähnlichen Stämme geprüft, die mir im Institut zur Verfügung standen, und habe außerdem zum Vergleich noch *Bacterium coli commune*, 2 Typhusstämmen und 3 typhusähnliche Bakterien, *Paratyphus Brion-Kayser* (Typus A), *Paratyphus Schottmüller-Seemann* (Typus B), sowie das Saarbrückener Stäbchen herangezogen.

Was die Herkunft der Ruhr- und ruhrähnlichen Stämme anbelangt, so stammt die Kultur „Shiga“ aus Japan, „Kruse“ aus Westfalen, „Th. Müller“ aus Graz, „Flexner-New Haven“ aus Nordamerika, die Stämme „Andersen“, „Przygode“, „Schwarte“, „Stratmann“, sowie „Barabinow“ aus der Döberitzer Epidemie des Jahres 1901. „Pseudodysenterie Kruse“ stammt aus Bonn, „Pseudodysenterie Lentz“ aus dem Sudan, „Deyke-Milz“ und „Deyke-Stuhl“ aus Konstantinopel, „Flexner I“, „Flexner-Manila“, sowie „Strong“ von den Philippinen. Der Rest der Stämme wurde aus den Faeces von Chinakriegern isoliert, und zwar „Meerkötter-Lazarett“, „Meerkötter ruhrähnlich“ und „Homey“ in Deutschland, die übrigen in China selbst (laufende No. 13 in Shanghai, laufende No. 11, 12, 17, 18, 19, 26—33 in Tientsin).

Die Kulturen laufende No. 1—13 sind nach den Ergebnissen der Agglutinationsprobe mit hochwertigem Ruhrserum echte Kulturen, während die No. 14—33 ruhrähnliche Bakterien enthalten.

Das Verhalten der untersuchten Bakterienstämmen in den beiden beschriebenen Nährböden geht aus den beigefügten Tabellen hervor. Die dort verzeichneten Zahlen geben den Grad der Säurebildung an, ausgedrückt in Kubikcentimeter Normalnatronlauge für 100 ccm Kulturflüssigkeit, und wurden derart ermittelt, daß zu 10 ccm der Kulturflüssigkeit tropfenweise so lange $\frac{1}{50}$ -Normalnatronlauge zugesetzt wurde, bis möglichst genau der Farbenton eines unbeimpften Kontrollröhrchens erreicht war. Bei stärkerer Koagulation wurden die Koagula unter leichtem Erwärmen durch Zusatz bestimmter Mengen von $\frac{1}{5}$ -Normalnatronlauge aufgelöst und mit $\frac{1}{50}$ -Normalschwefelsäure analog zurücktitriert. Jene Zahlen, die sich aus den gebrauchten Alkali-

Tabelle 1.
Mannit--Lackmus-Nutrose-Nährboden.

No.	Kultur	Nach 24 Stunden		Nach 48 Stunden	
		Aussehen der Kultur	Säure- bil- dung	Aussehen der Kultur	Säure- bil- dung
1	Shiga	unverändert	0	unverändert	0
2	Kruse	desgl.	0	desgl.	0
3	Th. Müller-Graz	desgl.	0	desgl.	0
4	Flexner-New Haven	desgl.	0	desgl.	0
5	Andersen	desgl.	0	desgl.	0
6	Przygode	desgl.	0	desgl.	0
7	Schwarte	desgl.	0	desgl.	0
8	Stratmann	desgl.	0	desgl.	0
9	Meerkötter-Lazarett	desgl.	0	desgl.	0
10	Homey	desgl.	0	desgl.	0
11	R. Wollers	desgl.	0	desgl.	0
12	R. Raatz	desgl.	0	desgl.	0
13	R. Grünwald	desgl.	0	desgl.	0
14	Flexner I	starke Rötung und Koagulation	0,66	starke Rötung und Koagulation	0,76
15	Flexner-Manila	desgl.	0,54	desgl.	0,60
16	Strong	starke Rötung, keine Koagulation	0,20	starke Rötung, keine Koagulation	0,46
17	Pseudodysenterie I	unverändert	0	unverändert	0
18	" II	leichte Rötung, keine Koagulat.	0,06	leichte Rötung, keine Koagulat.	0,04
19	" III	starke Rötung und Koagulation	0,94	starke Rötung und Koagulation	0,82
20	" Kruse	starke Rötung, keine Koagulation	0,54	desgl.	0,66
21	Meerkötterruhrähnlich	starke Rötung, keine Koagulation	0,52	starke Rötung und Koagulation,	0,90
22	Barabinow	starke Rötung und Koagulation, Gasbildung	1,54	desgl.	1,38
23	Pseudodysenterie Lentz	starke Rötung, keine Koagulation	0,56	starke Rötung und Koagulation	0,68
24	Deyke-Milz	starke Rötung, Koagulation, Gasbildung	0,60	starke Rötung und Koagulation, Gasbildung	0,58
25	Deyke-Stuhl	desgl.	0,72	desgl.	0,70
26	R. Zimmer	starke Rötung, keine Koagulation	0,48	starke Rötung, keine Koagulation	0,52
27	R. Dockhorn	desgl.	0,30	desgl.	0,42
28	R. Heckner	starke Rötung, Koagulation	0,52	starke Rötung und Koagulation	0,66
29	R. Nix	desgl.	0,40	desgl.	0,46
30	R. Müller	desgl.	0,56	desgl.	0,60
31	R. Dörschlag	desgl.	0,72	desgl.	0,76
32	R. 17. IX.	starke Rötung und Koagulation	0,10	desgl.	1,10
33	R. Strauch	unverändert	0	unverändert	0
34	Typhus Schweizer	starke Rötung, keine Koagulation	0,34	starke Rötung, keine Koagulation	0,52
35	" C	desgl.	0,30	desgl.	0,52
36	Paratyphus Brion-Kayser (Typus A)	starke Rötung, geringe Koagulation	0,36	starke Rötung, geringe Koagulation	0,52
37	Paratyphus Schottmüller - Seemann (Typus B)	starke Rötung, geringe Koagulation, Gasbildung	0,38	starke Rötung, Koagulation, Gasbildung	0,54
38	Saarbrückener Stäbchen	desgl.	0,44	desgl.	0,60
39	Bact. coli comm.	starke Rötung und Koagulation, Gasbildung	1,1	desgl.	1,46

Tabelle 2.
Maltose-Lackmus-Nutrose-Nährboden.

No.	Kultur	Nach 24 Stunden		Nach 48 Stunden	
		Aussehen der Kultur	Säure- bil- dung	Aussehen der Kultur	Säure- bil- dung
1	Shiga	geringe Rötung, keine Koagu- lation	0,04	geringe Rötung, keine Koagu- lation	0,04
2	Kruse	desgl.	0,04	desgl.	0,04
3	Th. Müller-Graz	desgl.	0,04	desgl.	0,04
4	Flexner-New Haven	desgl.	0,04	desgl.	0,04
5	Andersen	desgl.	0,04	desgl.	0,04
6	Przygode	desgl.	0,04	desgl.	0,04
7	Schwarte	desgl.	0,04	desgl.	0,04
8	Stratmann	desgl.	0,04	desgl.	0,04
9	Meerkötter-Lazarett	desgl.	0,04	desgl.	0,04
10	Homey	desgl.	0,04	desgl.	0,04
11	R. Wollers	desgl.	0,04	desgl.	0,04
12	R. Raatz	desgl.	0,04	desgl.	0,04
13	R. Grünwald	desgl.	0,04	desgl.	0,04
14	Flexner I	starke Rötung und Koagulation	0,72	starke Rötung und Koagulation	0,82
15	Flexner-Manila	starke Rötung, geringere Koagu- lation	0,60	desgl.	0,80
16	Strong	geringe Rötung, keine Koagu- lation	0,04	geringe Rötung, keine Koagu- lation	0,06
17	Pseudodysenterie I	desgl.	0,04	desgl.	0,04
18	" II	desgl.	0,04	desgl.	0,04
19	" III	starke Rötung und Koagulation	0,78	starke Rötung und Koagulation	0,82
20	" Kruse	geringe Rötung, keine Koagulat.	0,04	geringe Rötung, keine Koagulat.	0,1
21	Meerkötter ruhrähn- lich	deutliche Rötung, keine Koagu- lation	0,14	starke Rötung, keine Koagulation	0,28
22	Barabinow	starke Rötung und Koagulation, Gasbildung	1,08	starke Rötung und Koagulation, Gasbildung	1,42
23	Pseudodysenterie Lentz	deutliche Rötung, keine Koagu- lation	0,20	starke Rötung, keine Koagulation	0,52
24	Deyke-Milz	geringe Rötung, keine Koagulat., Gasbildung	0,04	geringe Rötung, keine Koagulat., Gasbildung	0,04
25	Deyke-Stuhl	desgl.	0,04	desgl.	0,04
26	R. Zimmer	starke Rötung, keine Koagulation	0,32	starke Rötung, keine Koagulation	0,56
27	R. Dockhorn	desgl.	0,42	desgl.	0,64
28	R. Heckner	geringe Rötung, keine Koagulat.	0,04	deutl. Rötung, keine Koagulation	0,2
29	R. Nix	starke Rötung, keine Koagulation	0,14	starke Rötung, keine Koagulation	0,16
30	R. Müller	desgl.	0,06	desgl.	0,08
31	R. Dörschlag	deutl. Rötung, keine Koagulation	0,30	starke Rötung, geringe Koagulat.	0,55
32	R. 17. IX.	starke Rötung und Koagulation	1,40	starke Rötung und Koagulation	0,92
33	R. Strauch	geringe Rötung, keine Koagulat.	0,04	leichte Rötung, keine Koagulation	0,08
34	Typhus Schweizer	starke Rötung, geringe Koagulat.	0,29	starke Rötung, geringe Koagulat.	0,44
35	" C	desgl.	0,30	desgl.	0,41
36	Paratyphus Brion- Kayser (Typus A)	starke Rötung, keine Koagulation	0,25	starke Rötung, keine Koagulation	0,26
37	Paratyphus Schott- müller - Seemann (Typus B)	starke Rötung, keine Koagu- lation, Gasbildung	0,22	starke Rötung, keine Koagu- lation, Gasbildung	0,33
38	Saarbrückener Stäb- chen	desgl.	0,30	starke Rötung, leichte Koagu- lation, Gasbildung	0,48
39	Bact. coli comm.	starke Rötung und Koagulation, Gasbildung	1,18	starke Rötung und Koagulation, Gasbildung	1,66

bzw. Säuremengen dann leicht berechnen ließen, können natürlich keine bindenden und sich stets gleichbleibenden Werte darstellen, die eventuell zur Artunterscheidung verwendet werden können. Sie schwanken vielmehr in gewissen Grenzen, besonders dann, wenn die Nährböden nicht aus Nutrose derselben Herkunft hergestellt werden, weil ja die Nutrose ein sich nicht stets gleichbleibendes Eiweißpräparat ist. Dennoch habe ich geglaubt, diese Zahlen, die sich mir als Mittelwerte bei mehrfachen Untersuchungen ergaben, mitteilen zu sollen, um ein anschaulicheres Bild über die von den einzelnen Bakterienstämmen gebildete Säuremenge zu geben.

Betrachten wir nun die in den Tabellen verzeichneten Resultate, so finden wir zunächst, daß die 13 echten Ruhrstämmen sich kulturell völlig gleich verhalten und daß der größte Teil der ruhrähnlichen Bakterien schon nach 24 Stunden eine auffallende Veränderung der Nährböden verursacht hat. Selbstverständlich fallen, da bei echten Ruhrbacillen niemals Gasbildung beobachtet wird, alle gasbildenden Stämme, auch wenn sie keine Farbänderung oder Koagulation des Nährbodens bewirkt haben, aus. Auch die beweglichen Arten (Pseudodysenterie I, Barabinow, Pseudodysenterie Lentz) kommen für eine kulturelle Differentialdiagnostik kaum in Frage und sind hier nur der Vollständigkeit halber mitgeprüft.

Ein Vergleich der beiden geprüften Nährflüssigkeiten untereinander fällt entschieden, ebenso wie dies Lentz bei den analogen Agarnährböden gefunden hat, zu Gunsten des Mannitnährbodens aus.

In ihm würden von den 26 geprüften Kulturen den echten Ruhrbacillen gegenüber nur „Pseudodysenterie I“ und „R. Strauch“ nicht zu differenzieren sein. Von diesen ist aber „Pseudodysenterie I“ beweglich und trübt Lackmusmolke, während der Stamm „R. Strauch“ in Bouillon stark Indol bildet und schon wegen seines dicken und übelriechenden Agarwachstums kaum zu Verwechslungen mit echten Ruhrbacillen führen kann.

Vergleicht man nun das Verhalten der geprüften Stämme in dem Mannit-Lackmus-Nutrose-Nährboden mit demjenigen im Mannit-Lackmus-Agar, so findet man eine weitgehende Übereinstimmung der Resultate. Die Farbveränderungen sind jedoch in dem beschriebenen flüssigen Nährsubstrat viel deutlichere, weil dem Agar gegenüber die Reduktion fortfällt, welche die Beurteilung der Farbe erschwert, und ferner, weil die gebildete Säure sich in dem flüssigen Nährboden leichter verteilen kann als in dem festen, in welchem, namentlich bei geringen Säuregraden, die um den Impfstich herum gelegenen zentralen Schichten des Agars anders gefärbt sind als die äußeren. Deshalb sind auch — und das scheint mir ein besonderer Vorteil gegenüber dem Mannitagar zu sein — die Reaktionen schon durchweg nach 24 Stunden deutlich genug sichtbar, um zu einem definitiven Urteil verwendet werden zu können. Als weiterer Faktor kommt die Koagulation des Nutrosekaseins hinzu. Daß dieselbe nicht lediglich durch den Grad der Säurebildung bewirkt wird, geht aus den in den Tabellen mitgeteilten Aciditätszahlen hervor. Der Stamm „Pseudodysenterie Kruse“ ruft z. B. bei Bildung von 0,54 Säure keine Koagulation hervor, während durch den Typus A der Paratyphusbacillen schon bei 0,36 Eiweißfällung eintritt. Möglicherweise ist hier die Art der gebildeten Säure entscheidend.

Weiterhin tritt bei der Verwendung der beschriebenen Nährflüssigkeit in Gärungskölbchen auch etwaige Gasbildung viel deutlicher zu

Tage als bei Stichkulturen in Mannitagar. Auffallend ist, daß der Stamm „Pseudodysenterie Lentz“ in der Mannit-Nutrose-Nährlösung kein Gas bildet, während dies im Mannitagar der Fall ist. Offenbar werden in letzterem die gasförmigen Zersetzungsprodukte aus dem Pepton des Agars gebildet, während die Eiweißstoffe der Nutrose nicht unter Gasbildung zersetzt werden. Man müßte dann annehmen, daß jenes Bakterium sich Albumosen gegenüber anders verhielte als Albuminaten gegenüber. Vielleicht ist aber auch das aus den Eiweißkörpern gebildete Gas in beiden Nährböden dasselbe, jedoch von solcher Beschaffenheit, daß es nur in dem festen Substrat in Erscheinung tritt, während es durch die Flüssigkeit absorbiert wird. Auch hier würde übrigens die Art der gebildeten Säure eine Rolle spielen können.

Die Maltose-Lackmus-Nutrose-Lösung ist, wie ein Blick auf Tabelle 2 lehrt, zur kulturellen Unterscheidung der Ruhrbacillen von den ruhrähnlichen Bakterien weit weniger brauchbar. Unter den hier erhaltenen Resultaten ist auffallend, daß die Stämme „Deyke-Milz“ und „Deyke-Stuhl“, die allen sonstigen kulturellen Eigenschaften nach als der Gruppe des *Bacterium coli commune* sehr nahestehend bezeichnet werden müssen, außer der Gasbildung den Nährboden unverändert lassen, während das *Bacterium coli* starke Rötung und Koagulation hervorruft.

Die hier beschriebene Mannit-Lackmus-Nutrose-Lösung ist also, wie aus den mitgeteilten Untersuchungen hervorgeht, kein Nährmedium, durch welches eine sichere Artunterscheidung des Ruhrbacillus und der ruhrähnlichen Bakterien ermöglicht wird. Die Züchtungsergebnisse in ihr stehen ja wohl auch, wie alle biologischen Reaktionen, gegenüber den Resultaten, die uns die Agglutination mit einem hochwertigen Dysenterieserum in viel kürzerer Zeit liefert, zurück; immerhin dürfte die in Frage stehende Züchtung, namentlich wenn sie mit der Anwendung der Lackmusmolke Hand in Hand geht, zur kulturellen Differenzierung des Ruhrbacillus unter Umständen mit Vorteil zu verwenden sein.

Nachdruck verboten.

Die Choleradiagnose mit Hilfe eines Spezialagars.

[Aus dem Königl. hygienischen Institut in Posen. Direktor: Medizinalrat Prof. Dr. Wernicke.]

Von

Dr. Hirschbruch,
Assistent am Institut.

und

Dr. Schwer,
Oberarzt im Inf.-Reg. 47,
kommandiert zum Institut.

Untersuchungen, die wir darüber angestellt haben, welche Bakterienarten auf dem Typhusagar nach v. Drigalski-Conradi wachsen, haben wir zur Veröffentlichung an die hygienische Rundschau gegeben und hoffen, daß die Arbeit bis zum Erscheinen der vorliegenden Zeilen bereits gedruckt vorliegen wird.

Bei Strichimpfungen auf D.-C.-Agar haben wir uns oft davon überzeugen können, daß Cholera nicht bloß sehr üppig wächst, sondern auch im Gegensatz zum *Bact. coli* schöne blaue Kolonien bildet, deren Farbe bereits nach kurzer Zeit — manchmal schon nach 6 Stunden —

deutlich erkennbar ist. Deshalb haben wir in der erwähnten Arbeit, welche nur die Form einer vorläufigen Mitteilung hatte, D.-C.-Agar angelegentlichst für die Cholera-diagnose empfohlen. Die Wichtigkeit der raschen und sicheren Diagnosestellung bei Cholera veranlaßte uns, diese Frage noch besonders zu prüfen, unabhängig von allen anderen in der vorläufigen Mitteilung außerdem berührten Punkten.

Die Untersuchungen, die diesem Zwecke speziell gewidmet sind, zerfallen in eine größere Zahl von Vorversuchen, welche wir mit verschiedenen Nährböden angestellt haben, und in einen Hauptversuch mit einem Nährboden, der sich als besonders zweckmäßig erwiesen hat.

Die Benützung von Kristallviolett im Verhältnis von 1:100 000 ist entsprechend der Vorschrift, die D. und C. gegeben haben, sehr zu empfehlen, da dasselbe ebensowenig wie bei Coli und Typhus die Wachstumsgeschwindigkeit der Cholera hemmt. Ein Vorzug des Zusatzes ist es ferner, daß eine große Zahl von Luftkeimen auf den präparierten Platten gar nicht angehen, und daß besonders die sonst so weit verbreiteten und üppig alles andere überwuchernden Bakterien aus der Gruppe des Kartoffelbacillus erst nach mehreren Tagen — also wenn unsere Platten längst außer Versuch sind — kleine Kolonien gebildet haben.

Dagegen haben wir uns für die Bereitung unseres Choleraagars nach vielfachen Vorversuchen dahin entschieden, auf den Zusatz von Nutrose zu verzichten. Bei der frühzeitigen Bildung blauer Cholera-kolonien kommt es ganz wesentlich darauf an, den Agar mit denjenigen Eigenschaften auszustatten, welche eine frühzeitige Rotfärbung der Kolonien säurebildender Bakterien, besonders des *B. coli*, ermöglichen.

Wir halten es auch für dringend notwendig, einen der Cholera-diagnose dienenden Nährboden rasch herstellen zu können. Das läßt sich, ohne die Güte des Nährbodens zu beeinträchtigen, durch Verwendung von Fleischextrakt sehr gut bewerkstelligen.

Bei der vergleichswisen Benützung eines schwach alkalisierten und eines stärker alkalischen Milchzucker-Lackmusnährbodens haben sich beide als tauglich erwiesen. Der schwach alkalische Agar ist aber entschieden reaktionsfähiger und darum zweckmäßiger. Auf ihm hat nach 21 Stunden Cholera bis 2 mm, Coli bis $3\frac{1}{2}$ mm große Kolonien gebildet. Coli ist dabei rot mit deutlicher roter Säurezone und besitzt bereits in seinen größeren Kolonien konzentrische Schichtung. Cholera ist von schöner blauer Farbe ohne farbige Zonenbildung des Agars um die Kolonien herum, die von gleichmäßig homogener Beschaffenheit sind. Die Cholera-kolonien verlieren allmählich ihre glasige Beschaffenheit und sind nach 2 Tagen in Aufsicht intensiv blau gegenüber dem violett-roten Coli. Die ganze Platte ist durch die Säurebildung des Coli rot geworden. Bei Durchsicht sind die Coli-Kolonien leuchtend rot, während die Cholera sich durch ihre dunkelblaue Farbe und minimale Durchsichtigkeit überall deutlich abhebt, auch dort, wo zwei verschiedenartige Kolonien ineinander gewachsen sind, oder wo eine Cholera-kolonie in einem ganzen Streifen von Coli vereinzelt eingebettet ist. Die Größe der Säurebildung, die Nähe der Coli-Kolonien beeinträchtigen weder das Wachstum noch die Erkennbarkeit der Cholera; im Gegenteil: sie lassen den Farbenunterschied nur um so deutlicher hervortreten.

D. und C. haben in der richtigen Erkenntnis, daß die Erkennung der Typhuskolonien auf ihrem Agar durch starke Säurebildung von

seiten des Coli erschwert, ja unmöglich gemacht wird, darauf Bedacht genommen, durch hohen Agargehalt (3-proz.) die Diffusionsmöglichkeit für die entstehende Säure zu vermindern. Bei dem Nährboden, den wir für unsere Zwecke gebrauchen, war es gerade nützlich, die Ausbreitung der Säurezone nicht zu hindern, zumal Cholera nicht bloß selbst blaue Kolonien bildet, sondern auch genügend Alkali frei macht, um sich in schwach alkalischem Agar von violetter Aussehen mit einer blauen Laugenzone zu umgeben.

Wir glauben bei dem raschen Wachstum der Cholera und ihrer starken Alkalibildung, die doch nur nötig hat, den an sich schon blauen Farbton des Nährbodens noch zu vertiefen, daß es bei der Diagnose der Cholera aus Faeces durch Farbenreaktion des Nährbodens gerade darauf ankommt, die möglichst frühzeitige Rötung der Coli-Kolonien sicherzustellen.

Wir haben auch umgekehrt den Versuch gemacht, ein Coli-Cholera-Gemisch auf einem sauren Lackmus-Milchzuckernährboden zu züchten. Die Alkalibildung reicht dann aber doch nicht aus, um die Cholera-kolonien schnell genug blau zu färben.

Was nun die Methodik bei der Anlegung der Kulturen anbetrifft, ist es natürlich kaum möglich, mit einem Glasspatel, wie ihn Drigalski und Conradi angegeben haben, auf Agar von geringerer Konzentration Flächenimpfungen vorzunehmen, ohne den Nährboden zu zerquetschen oder zu zerreißen. Wir sind sowohl mit einer kleinen Oese aus dickem Platindraht wie mit einer aus Glas gefertigten geköpften Nadel, die leicht wie ein Trommelschlägel gefaßt wird, sehr gut zum Ziele gekommen und haben nach der Ausstrichmethode stets einzeln liegende Kolonien auf dem größten Teile der Platte erhalten. Der Vorteil besteht darin, daß wir nicht Serien von Kulturen anzulegen genötigt sind. Wollen wir einmal 2 Platten benutzen, dann ist jede für sich zu beimpfen und jede für sich brauchbar als Ergänzung und zur Kontrolle der anderen Platte.

Die Unterscheidbarkeit verschieden gefärbter Kolonien auch dort, wo die Unterschiede nur gering sind, wird durch eine mittlere Dicke der Agarschicht erleichtert. Ungefähr 8 ccm von dem Agar, in eine Petrische Schale gegossen, geben die geeignetste Dicke.

Wir haben den Agar für unsere Cholerauntersuchungen in folgender Art und Weise hergestellt:

20 Agar, 10 Liebigs Fleischextrakt, 10 Pepton, 5 Kochsalz werden mit 1000 Leitungswasser $1\frac{1}{2}$ Stunde gekocht, filtriert und wieder $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht. Nach Zusatz von 15 g Milchzucker wird $\frac{1}{4}$ Stunde gekocht und mit einer sterilen wässrigen Sodalösung von beliebigem, aber nicht zu geringem Gehalt so weit alkalisiert, daß die Blaufärbung von rotem Lackmuspapier deutlich, die etwas tiefere Bläuung von blauem Lackmuspapier gerade eben bemerkbar ist.

Es folgt dann, genau wie bei dem Typhusnährboden von v. Drigalski und Conradi, der Zusatz von 130 ccm Lackmuslösung nach Kubel-Tiemann, die $\frac{1}{4}$ Stunde gekocht hat und von 10 ccm einer Lösung, die von 0,1 Kristallviolett B (Höchst) in 100 ccm heißen sterilen dest. Wassers hergestellt ist.

Nach dem Umschütteln werden die Platten (mit je ca. 8 ccm Nährboden) gegossen und offen erstarren und abkühlen gelassen. Das dauert etwa $\frac{1}{2}$ Stunde. Die Schalen sind dann gebrauchsfertig.

Wir haben nun bei den zu beschreibenden Versuchen stets 2 Schalen

nach der Strichelmethode beimpft. Das Resultat war immer auf beiden das Gleiche.

Die Untersuchung der Kulturen im auffallenden Licht (A) haben wir derart angestellt, daß wir auf einem gut belichteten Tisch, aber nicht direkt im Sonnenschein, ein Blatt weißes Papier legten und die Platten nach Abnahme des Deckels in einigen Centimetern Entfernung parallel darüber hielten.

Bei durchfallendem Licht (D) untersuchten wir, indem wir die Schalen, ebenfalls nach Abnahme des Deckels, vertikal zwischen unser Auge und die Lichtquelle brachten und dann die Schale um ein geringes senkten.

Wir haben die Untersuchung nach 10 und dann nach 20 Stunden vorgenommen und die Zeit für die Beimpfung absichtlich so gewählt, daß die Zeit für die erste Untersuchung auf die Abendstunden fiel. Wir wollten gerade für die frühzeitige Diagnose — wenn also die Farbdifferenzen in den Kolonien der einzelnen Bakterienarten noch nicht so deutlich vorhanden sind — uns die Beobachtungsbedingungen möglichst erschweren. Wir haben bei künstlicher Beleuchtung (Gasglühlicht) untersucht.

Es wurden sowohl mit Reinkulturen wie künstlichen und natürlichen Bakteriengemischen Platten beimpft. Die Cholera-Faecesplatten haben wir aus einer Aufschwemmung von diarrhäischen Faeces in Peptonwasser unter Zusatz von Choleravibrionen frisch angelegt, ohne vorausgegangene Anreicherung.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind folgende:

1) *Bact. coli* (Stamm H) hat nach 10 Stunden aus einer Aufschwemmung in Peptonwasser, die wir zur Beimpfung der Schalen benutzten, Kolonien gebildet, welche in A und D rot sind. Auch der Nährboden ist in der Umgebung der Kolonien schon vielfach rot gefärbt (Säurezone). Diese Erscheinungen sind nach 20 Stunden noch viel deutlicher geworden. Hier sei auch davor gewarnt, die Platten allzu dünn mit Agar zu beschicken. (Beim Typhusagar, der strikte nach den Vorschriften von v. Drigalski und Conrad hergestellt ist, trifft daselbe zu.) Das *B. coli* bildet nämlich, nachdem die Säureproduktion vorüber ist, wieder Alkali. Auf Agar, den wir ohne Zusatz von Milchsäure bereitet, den wir aber mit Milchsäure schwach sauer gefärbt hatten, bildete das *Coli*-Bakterium sehr bald Alkali. Wir erklären uns die Erscheinung so, daß nach dem Verbrauch des Milchsücker die hierbei gebildete Milchsäure weiter zerlegt wird. Dabei muß der alkalische Grundcharakter des Nährbodens wieder zum Vorschein kommen. Diese Erscheinung tritt nicht regelmäßig, und gewöhnlich auch erst auf alten Schalen ein. Auf zu dünn angelegten Agarflächen kann sich eine frühzeitige Alkalibildung durch *B. coli* störend bemerkbar machen. Solche Kolonien sind dann in A blau, in D weißlich blau und wenig durchsichtig. Sie können aber auf jüngeren, falsch hergestellten Schalen zu Verwechslungen mit Cholera gar keinen Anlaß geben. Bei richtiger Dicke des Agars ist das *B. coli* innerhalb der untersuchungsgerechten Fristen stets rot. — Ein zweiter *Coli*-Stamm besitzt dieselben Eigenschaften.

2) *Bacillus typhi* (Stamm L I): Nach 10 Stunden sind nur sehr kleine Kolonien gewachsen, die in D deutlich blau sind. Bei A ist ihre Farbe noch nicht mit Sicherheit festzustellen.

Die 20-stündige Kultur besitzt bis 4 mm im Durchmesser große

Kolonieen von glasiger Beschaffenheit. Sie sind in Aufsicht und Durchsicht blau. Ein zweiter Stamm hat gleiche Eigenschaften.

3) Cholera: Zur Untersuchung kamen 4 Stämme:

a) Calcutta ist nach 10 Stunden sehr üppig gewachsen. Die in A und D blauen Kolonieen sind bis $1\frac{1}{2}$ mm groß. Die jungen Kolonieen sind dabei tautropfenartig-glasig. Die blaue Farbe der Cholera auf dem Nährboden ist eine viel sattere als die des Typhus. Der Agar besitzt schon in der Umgebung vieler junger Kolonieen eine blaue Zone. Der Nährboden ist nämlich von vornherein violett.

Nach 20 Stunden sind die Kolonieen bis $2\frac{1}{2}$ mm im Durchmesser. Bei A erscheinen sie milchigblau, bei D tiefhimmelblau. Die ganze Agarfläche ist inzwischen intensiv blau geworden.

b) Jaffa weist nach 10 Stunden Kolonieen bis zu 2 mm Durchmesser auf.

c) Cholera Aegypten 73 wächst besonders üppig. Nach 20 Stunden sind bis 5 mm große Kolonieen vorhanden.

d) Cholera Aegypten 74 verhält sich genau wie Cholera Calcutta.

4) Nicht-Cholera Aegypten V wächst genau so wie Cholera.

5) Nicht-Cholera Aegypten 77 gleicht nach 10 Stunden genau der echten Cholera; nach 20 Stunden sind die Kolonieen aber nicht so glasig und heller blau als bei Cholera.

6) Nicht Cholera Aegypten 62 ist opaker als Cholera.

7) *Vibrio terrigenus* ist nach 10 Stunden nicht gewachsen. Nach 20 Stunden sind vereinzelt Kolonieen vorhanden, die in A und D blau, aber sehr opak sind.

8) *Vibrio aquatilis* gleicht dem vorigen.

9) *Elbvibrio*: Nach 10 Stunden nihil; 20-stündig ganz wie Cholera.

10) *Vibrio Finkler*: wächst langsamer als Cholera, ähnelt ihr aber sonst sehr.

11) *Vibrio Metschnikoff* verhält sich genau wie Cholera.

12) Der *Bacillus acidi lactici* besitzt nach 10 Stunden bis 4 mm große Kolonieen, die in A und D rot sind. Eine starke rote Säurezone umgibt jede Kolonie. Nach 20 Stunden ist der ganze Agar rot. Wir wollten sehen, ob durch raschen Milchzuckeraufbrauch etwa frühzeitige Blaufärbung auftritt.

13) *Fluorescens liquefaciens*: Einer von unseren Stämmen wechselt in D nach 10 Stunden bei der geringsten Bewegung der Platte die Farbe zwischen blau, grün und rot. In A ist er rot mit Säurezone. Die Kolonieen sind opak. — Es gibt aber auch blau wachsende Stämme. Doch ist schon die junge Kolonie meist deutlich opak.

14) *Proteus mirabilis*: Nach 10 Stunden wechselt die Farbe bei D zwischen blau und grün. Bei A erkennt man, daß die ganze Agarfläche hauchförmig bewachsen ist. Einzelne Kolonieen heben sich wohl aus der ganzen Masse heraus und sind blau. Es fehlt aber gegenüber Cholera die scharfe Begrenzung. Nach 20 Stunden sind die Kolonieen tautropfenartig durchsichtig und blau. Es fehlt aber auch jetzt die scharfe Begrenzung; die Kolonieen sind auch flacher als bei Cholera. Eine gewisse Ähnlichkeit ist aber vorhanden.

15) *Coli* und Cholera-Jaffa aus einem frischen Gemisch in Peptonwasser. Die Unterschiede sind nach 10 Stunden bei Durchsicht vorzüglich erkennbar und auch in A trotz Lampenbeleuchtung noch leidlich gut wahrnehmbar. Die *Coli*-Kolonieen sind größer (bis $3\frac{1}{2}$ mm), weniger gut durchsichtig und rot; Cholera ist bei einer Größe der

Kolonieen bis 2 mm tautropfenartig durchsichtig, homogen und blau. Nach 20 Stunden ist die Unterscheidung ganz leicht und zwar auch dort, wo in dem meist roten Strich einzelne blaue Cholerakolonieen eingelagert sind. Die Erkennbarkeit der Cholera wird durch die rote Zone der Coli-Kolonieen nicht beeinträchtigt, sondern tritt nur um so deutlicher hervor.

16) Coli + Typhus: Typhuskolonieen sind nur bis 1 mm groß und nach 10 Stunden schwer erkennbar, weil auch die kleinsten Coli-Kolonieen noch nicht rot sind. Nach 20 Stunden ist die Unterscheidung sehr gut möglich. Das Blau des Typhus ist heller als bei der Cholera. Die Erkennbarkeit des Typhus wird durch die Säurezone des Coli-Bakteriums sehr beeinträchtigt.

17) Typhus + Cholera: Nach 10 Stunden ist aus der Anwesenheit von blauen Kolonieen, die bis 3 mm im Durchmesser groß sind, erkennbar, daß die großen Kolonieen nicht Typhus sind; sie können Cholera sein. Die weitere Untersuchung sichert die Diagnose. Nach 20 Stunden sieht man nur wenig Typhus. Seine Kolonieen sind heller und eine Spur opaker als bei Cholera.

18) Coli + Typhus + Cholera: Rote und blaue Kolonieen sind in der 10 Stunden alten Kultur deutlich unterscheidbar. Aber erst nach 20 Stunden können alle drei Bestandteile des Gemischs schon durch ihr Verhalten auf dem Agar unterschieden werden.

19) Faeces I (diarrhöisch): Nach 10 Stunden sind alle Kolonieen in D entweder rot und opak oder sie schillern in verschiedenen Farben. In A sind alle rot. Nach 20 Stunden sind ganz vereinzelte blaue Kolonieen sichtbar. Sie sind aber so opak, daß es sich gar nicht um Cholera handeln kann. (Eine Verwechslung mit Typhus wäre eher möglich.)

20) Faeces II (diarrhöisch): Die 10-stündigen Platten zeigen dasselbe Bild wie die vorigen. Nach 20 Stunden ist nur auf einer von beiden Platten eine einzige Kolonie, die man eventuell für Cholera halten könnte, doch ist auch sie opaker. Eine einfache mikroskopische Untersuchung zeigt eine große Staphylokokkenart.

21) Faeces + Cholera: Wir haben uns 4 Gemische von diarrhöischen Faeces mit unseren 4 Cholerastämmen angelegt und haben aus einer Aufschwemmung des Gemischs in Peptonwasser Platten beimpft. Wir konnten in allen Fällen nach 10 Stunden die Diagnose stellen; nach 20 Stunden können Cholerakolonieen selbst bei flüchtiger Betrachtung der Kultur gar nicht übersehen werden. Selbst am Rande miteinander verwachsene Kolonieen von Coli und Cholera sowie Mischkolonieen lassen ohne Schwierigkeit die Choleradiagnose stellen.

22) Kanalwasser: Wir haben etwas Wasser aus der Warthe entnommen, dort wo das Abwasser in den Fluß mündet. Einige Kubikcentimeter davon haben wir etwa mit der gleichen Menge Peptonwasser versetzt und in den Brutschrank gestellt. Nach 12 Stunden wurden mit Material, das der Oberfläche des Gemischs entnommen war, 2 Platten beimpft, die nach 10 Stunden noch keine Diagnose zuließen. Nach 20 Stunden waren zwar viele blaue Kolonieen vorhanden, die aber zu meist stark opak waren. Nur wenige Kolonieen kamen als choleraverdächtig in Betracht. Ein einfaches Präparat zeigte sofort, daß es sich nicht um Vibrionen handelte.

23) Kanalwasser + Cholera: Nach Zusatz einer minimalen Menge von Cholera zum Kanalwasser wurde in der gleichen Weise wie bei dem Vorigen angereichert und ausgestrichen. Nach 10 Stunden

können Cholera-Kolonien durch Untersuchung verdächtiger Kolonien erkannt werden. Nach 20 Stunden ist die direkte Diagnose möglich.

Wenn auch im Vorstehenden die Rede davon war, daß die Cholera gleich auf der Platte erkennbar ist, so darf doch nicht vergessen werden, daß eine ganze Reihe von cholera-ähnlichen Bakterien sehr ähnlich innerhalb der zur Untersuchung geeigneten Zeit — 10—20 Stunden — auf unserem Choleraagar wächst. Das mikroskopische Präparat, die Agglutinationsprüfung und der Pfeiffersche Versuch sind selbstverständlich nicht zu entbehren.

Es handelt sich nun zunächst darum, ob die Form der Vibrionen, die auf unserem Nährboden gewachsen sind, im gefärbten Ausstrichpräparat erkennbar ist. Der *Vibrio* der Cholera, wie der *Vibrio* Metschnikoff behalten ihre charakteristische Form sowohl in 10-stündigen wie in 2 und 3 Tage alten Kulturen. Auch die Beweglichkeit der Vibrionen hat durch das Wachstum auf unserem Nährboden nicht im geringsten gelitten. Wir haben fernerhin noch von Metschnikoff und Cholera-Jaffa, die auf Cholera-Nährboden gewachsen waren, hängende Tropfen in Choleraserum 1:1000 angelegt, dessen Titer im Institut für Infektionskrankheiten in Berlin auf 1:10000 festgestellt war. Die Agglutination der Cholera-Vibrionen war eine momentane, während der *Vibrio* Metschnikoff vorzüglich seine Beweglichkeit behielt.

Danach halten wir unseren Choleraagar für sehr geeignet zur Stellung der Cholera-diagnose. Die Kolonien sind nicht nur sehr frühzeitig vorzüglich erkennbar, sondern können auch wegen ihrer charakteristischen Färbung gar nicht übersehen werden. Selbst die rote Säurezone der *Coli*-Kolonien fördert eher die Erkennbarkeit der Cholera, als daß sie dieselbe hinderte. Wir halten es für zweckmäßig, mit jeder Serie von Platten vergleichshalber eine Platte mit in den Brutschrank zu stellen, die ebenfalls mit dem zu untersuchenden Material beschickt ist, welchem künstlich Cholera beigemischt wurde.

Die Untersuchung verdächtiger Kolonien dürfte am einfachsten im hängenden Tropfen mit Choleraserum in zweckmäßiger Verdünnung erfolgen. Die Untersuchung ist, wenn die Serumverdünnung erst einmal angestellt ist, viel rascher ausführbar, als die Untersuchung im gefärbten Präparat und gibt uns auf einmal über Gestalt, Beweglichkeit und Agglutinierbarkeit des verdächtigen Materials Aufschluß. In einer Viertelstunde kann man mindestens 8 solcher Präparate anfertigen und untersuchen. Bei positivem Ergebnis wird dann noch der Pfeiffersche Versuch als Schlußglied angefügt.

Möge sich unser Choleraagar in der Praxis ebensogut bewähren wie bei unseren Laboratoriumsversuchen!

Nachdruck verboten.

Ueber die Trinkwasserdesinfektion mit Jod nach Vaillard.

[Aus der bakteriol. Untersuchungsstation des kgl. Garnisonlazarettes
Würzburg.]

Von **Gust. Obermaier**, Militärapothecker.

In einer Arbeit über Trinkwasserdesinfektion im Felde, veröffentlicht in den „Archives de médecine et de Pharmacie militaires, 1902, No. 7“, teilte Vaillard mit, daß 0,06 g Jod pro Liter Wasser in 10—15 Minuten die meisten Bakterien, namentlich Cholera-, Typhus- und Coli-Bacillen abtöten. Nur einige widerstandsfähige Bakterien, die aber keine Bedeutung für den Organismus haben, blieben am Leben. Um freies Jod in Lösung zu erhalten, empfiehlt Vaillard, im Wasser 0,1 g Weinsäure per Liter zu lösen, dann 0,1 g Jodkali zuzufügen und schließlich durch Zusatz von 0,0156 g jodsaurem Natrium Jod frei zu machen, das durch das Jodkali in Lösung gehalten wird. Nach 10—15 Minuten fügt man zur Neutralisation des Jods 0,116 g Natriumthiosulfat zu, wodurch das Jod als Jodnatrium gebunden wird. Wichtig ist ferner, das Jod in einer kleinen Quantität Wasser frei zu machen, weil kalkhaltiges Wasser in der Gesamtmenge die Weinsäure sofort als Calciumtartrat binden und so jede Reaktion verhindern würde.

Auf Anregung des Herrn Stabsarztes und Privatdozenten Dr. Dieudonné unterzog ich das Verfahren einer Nachprüfung, indem ich zuerst Versuche mit Trink- und Flußwasser, dann mit Cholera-, Typhus-, Coli- und Dysenteriebacillen anstellte. Zunächst bereitete ich mir die folgenden Lösungen der Reagentien:

- 1) Weinsäurelösung: 1:50,
- 2) Jodkalilösung: 1:50,
- 3) Natriumjodatlösung: 0,156:50,
- 4) Natriumthiosulfatlösung 1,16:50,

so daß für jeden Versuch von jeder Lösung 5 g pro Liter Wasser benötigt wurden. Die Lösungen wurden nach jedem Versuch sterilisiert, da insbesondere die Weinsäure zahlreiche Bakterien enthielt. Das Jod wurde in der Weise frei gemacht, daß je 5 g der Lösungen 1, 2 und 3 in einem Reagenzglase gemischt und dann zum betreffenden Versuch gefügt wurden. Nach 15 Minuten Einwirkung wurden 5 g der Lösung 4 direkt zugegeben.

Zunächst wurden Versuche mit je 1 l Trinkwasser der Würzburger städtischen Wasserleitung, das durchschnittlich 50—100 Keime im Kubikcentimeter enthält, gemacht. Nach Einwirkung der Reagentien wurden von jedem Liter mit einer sterilen Pipette je $\frac{1}{2}$ ccm auf mehrere Bouillonröhrchen übertragen. Innerhalb einer 8tägigen Beobachtungsdauer blieben die Röhrchen steril. Mehrmalige Wiederholungsversuche bestätigten die obigen Beobachtungen. Andere Resultate lieferten mehrfache Versuche mit je 1 l Flußwasser des Mains nach dessen Durchfluß durch die Stadt Würzburg. Bereits nach 24 Stunden, spätestens aber nach 48 Stunden, zeigte ungefähr die Hälfte der Bouillonröhrchen Wachstum, während die andere Hälfte steril blieb. Um die Zahl und die Art der noch lebensfähigen Keime zu konstatieren, übertrug ich je $\frac{1}{2}$ ccm desinfiziertes Mainwasser auf Agarplatten. Nach 24 Stunden waren 75—100 Keime

auf jeder Platte gewachsen. Eine ganz bedeutende Abnahme der Keime war also sicher vorhanden. Die Kolonien waren *Subtilis*- und *Sarcina*-Arten. Eine vollkommene Sterilisation, wie sie Vaillard bei Seiwasser beobachtet hat, konnte niemals erzielt werden.

Bei den Versuchen mit *Vibrio cholerae*, *B. typhi*, *B. coli* und *B. dysenteriae* wurden stets frische, nicht über 24 Stunden alte Agarkulturen verwendet. Von denselben wurde je eine halbe Kultur in einem 100 ccm fassenden Kölbchen in 100 ccm Flüssigkeit (Leitungs- oder Mainwasser) aufgeschwemmt. Zuerst wurde eine Choleraaufschwemmung in sterilem Leitungswasser mit 6 cg Jod behandelt und nach Neutralisation je $\frac{1}{2}$ ccm Flüssigkeit auf mehrere Bouillonröhrchen übertragen. Die Röhrchen wurden 8 Tage auf 37° gestellt. In Uebereinstimmung mit Vaillard konnte kein Wachstum festgestellt werden. Die gleichen Versuche wurden mit im Autoklaven sterilisiertem Mainwasser, das reich an organischen Substanzen ist, wiederholt. Auch hier wurde dasselbe günstige Resultat erhalten. Ganz anders fielen aber die Resultate aus, als das von Schüder¹⁾ bei seiner Nachprüfung des Schumburgschen Bromverfahrens angegebene Peptonanreicherungsverfahren benutzt wurde, das auch Rabs²⁾ bei seiner Arbeit über Trinkwasserdesinfektion mit Chlor mit Erfolg anwandte. Zunächst wurde eine 10-proz., sterile Peptonkochsalzlösung hergestellt und davon zu den mit Jod behandelten und neutralisierten Aufschwemmungen der Cholera-vibrionen in sterilem Leitungs- bzw. Mainwasser soviel gegeben, daß eine 1-proz. Lösung entstand, die 24 Stunden auf 37° gestellt wurde. Nach dieser Zeit wurde aus jeder Probe je $\frac{1}{2}$ ccm Flüssigkeit auf verschiedene Peptonröhrchen übertragen und auf 37° gestellt. Nach 6 bis 8 Tagen war in ungefähr der Hälfte der Peptonröhrchen Wachstum und mehr oder minder starke Cholerarotreaktion zu beobachten. Die Cholera-vibrionen waren also nur zum Teil getötet, zum Teil scheinbar durch das Jod nur gelähmt.

Bei den Versuchen mit *B. typhi* und *B. coli* wurden frische Kulturen in sterilem Main- und Leitungswasser aufgeschwemmt und mit Jod wie oben behandelt. Nach Neutralisation wurde je $\frac{1}{2}$ ccm auf eine Reihe von Bouillonröhrchen übertragen; doch konnte in keinem Falle Wachstum erhalten werden. Da ein Anreicherungsverfahren wie bei Cholera nicht bekannt ist, so konnte auch nicht konstatiert werden, ob die Bakterien hier tatsächlich getötet, nicht bloß gelähmt werden. Es wurde zwar auch hier das Peptonanreicherungsverfahren versucht, doch war das Resultat dasselbe. Die Versuche mit *B. dysenteriae* verliefen genau ebenso wie mit *B. typhi* und *B. coli*.

Abgesehen von den Desinfektionsversuchen mit Flußwasser, scheinen also alle Bakterien abgetötet zu werden, mit Ausnahme der Cholera-vibrionen. Da aber diese in ihrem sonstigen Verhalten weit empfindlicher sind als die übrigen untersuchten pathogenen Keime, so dürfen wir mit Recht annehmen, daß auch diese Keime nur gelähmt werden, und daß lediglich der Mangel eines Anreicherungsverfahrens die Resultate günstig erscheinen läßt.

Von einer Vermehrung der Jodmenge wurde aus dem Grunde abgesehen, weil der Gehalt an Jodnatrium zu groß würde und das Wasser seinen natürlichen Geschmack verlöre. Versuche über Verlängerung der

1) Zeitschrift für Hygiene. Bd. XXVII. 1901. Heft 2.

2) Hygien. Rundschau. 1901. No. 22. p. 1087.

Einwirkungsdauer des Jods wurden deshalb nicht angestellt, weil es sich im Felde lediglich darum handelt, auf möglichst schnelle Weise brauchbares Trinkwasser zu erhalten.

Auch diese Versuche zeigen von neuem die große Brauchbarkeit der von Schüder angegebenen Methode zur Prüfung von Wasserdesinfektionsmitteln.

Nachdruck verboten.

Ein Apparat zur Züchtung von Mikroorganismen in beweglichen flüssigen Medien.

[Aus dem hygienisch-bakteriologischen Laboratorium an der k. k. landwirtschaftlich bakteriologischen und Pflanzenschutzstation in Wien.]

Von Dr. E. Wiener.

Mit 1 Figur.

Methoden, bakterienhaltige Flüssigkeiten möglichst ausgiebig mit Luft in Berührung zu bringen, stehen derzeit in Betrieben in Anwendung, bei welchen kontinuierliche, möglichst gleichmäßige Gärung bewirkt werden soll. Man verfolgt mit diesen Methoden den doppelten Zweck, die gärende Flüssigkeit einerseits mit möglichst viel Sauerstoff in Berührung zu bringen, andererseits die Entwicklung anaerober Bakterien hintanzuhalten. Noch vor einem Jahrzehnt waren diese Methoden ungemein primitiv.

Jaquem in¹⁾ beschreibt in seinem großen Werke eine der ersten derartigen Methoden, welche darin bestand, den Most in den großen Gärungsbottichen in Mengen von mehreren Hektolitern, tunlichst vom Grunde desselben häufig heraufzuschöpfen oder zu pumpen und denselben dann als Regen, also fein verteilt, wieder zurückfließen zu lassen, welche Prozedur durch 2–3 Tage wiederholt wird. Schon etwas früher hatte Cambon²⁾ einen einfachen Apparat angegeben, durch welchen die Vorteile der Durchlüftung aufrecht erhalten, während die Nachteile, die leichte Verunreinigung der Gärungsflüssigkeit durch Luftkeime, hintangehalten werden sollen. Cambon läßt nämlich das große Gärungsreservoir luftdicht schließen, nachdem es mit der in Gärung zu setzenden Flüssigkeit fast vollgefüllt ist. Die sich entwickelnde Kohlensäure drückt die Flüssigkeit durch ein um ein geringes über dem Grunde des Reservoirs in dasselbe von außen einmündendes Rohr nach oben, und wird dieselbe in ein kleineres, oberhalb des Reservoirs befindliches, mit demselben durch ein senkrechtes Rohr kommunizierendes kleineres Gefäß entleert. Dieses letztere ist mit einem Schwimmer versehen, wird also, wenn die Flüssigkeit ein gewisses Niveau erreicht hat, automatisch entleert. Auf diese Weise bleibt die Flüssigkeit in fortwährender Cirkulation und kommt mit Luft ausgiebig in Berührung. Ein wesentlicher Mangel dieses Apparates bestand noch immer darin, daß die Luftkeime gar nicht oder nur ungenügend abgehalten waren, woraus die bekannten Unzukömmlichkeiten entstanden. Jaquem in hat später einen, für die

1) Les fermentations rationelles. Malzéville-Nancy (Thomas) 1900.

2) Progrès agricole. 2. Aug. 1891.

Vergärung großer Flüssigkeitsmengen geeigneten Apparat konstruiert, bei welchem das Prinzip, die Luftkeime am Eindringen in die Gärungsflüssigkeit zu verhindern, in Anwendung kam, zu welchem Zwecke die durch ein eigenes Rohr zugeführte Luft durch eine Lage Salicylwatte geführt, vorher auch noch gewaschen und dann erst in die Gärungsreservoirs geleitet und durch die Flüssigkeit gepreßt wurde.

In die Bakteriologie fanden diese Methoden bisher eigentlich keinen Eingang, trotzdem das Studium des Wachstums der pathogenen Mikroorganismen unter reichlicher Sauerstoffzufuhr ganz neue Gesichtspunkte eröffnen mag. Die bisherigen Bestrebungen gingen eigentlich nur dahin, wenn schon das Verhalten der Bakterien in beweglichen Medien beobachtet werden sollte, den Blutkreislauf zu imitieren und mit Hilfe eigens konstruierter Röhren und Apparate die mit Mikroorganismen beschickte Nährflüssigkeit in Cirkulation zu bringen.

Einen derartigen Apparat hat Welleminsky im September v. J. auf dem Kongreß Deutscher Naturforscher und Aerzte beschrieben. Da mir eine authentische Beschreibung des sinnreich konstruierten Apparates nicht zur Verfügung stand, möge entschuldigt werden, wenn die folgenden Angaben nicht vollkommen genau sind.

Der Apparat Welleminskys besteht aus einem geschlossenen Röhrensystem von einigen Millimetern innerer Lichte: die Röhren sind derart aneinander gefügt, daß sie ein Viereck mit 2 kürzeren und 2 längeren Schenkeln bilden; in denselben sind stellenweise Glasventile angebracht um die in eine Richtung bewegte Flüssigkeit am Rücklauf zu verhindern. An einer Stelle ist ein längeres Glasrohr angebracht, welches am oberen Ende von breiterem Durchmesser ist. Durch dieses Rohr werden die Kulturmedien eingegossen und tritt dann auch die Luft ein. Um aber Luftkeime tunlichst abzuhalten, ist diese breitere Mündung des Glasrohres nicht ganz offen, sondern bis auf eine kleine Oeffnung zugeschmolzen, an welche ein nach innen mündendes, enges U-Röhrchen angeschmolzen ist, welches die Luftkeime zurückhalten, so daß eine Verunreinigung der Kulturflüssigkeit durch dieselben verhindert werden soll. Dieses ganze System wird auf ein durch eine Turbine bewegtes Gestell gegeben und um die Achse des Gestelles derart bewegt, daß die Flüssigkeit in dem Röhrensystem sich immer nach einer bestimmten Richtung vorwärtsbewegt; am Rücklauf ist sie durch die Ventile verhindert. Der ganze Apparat kann auch im Thermostaten angebracht werden.

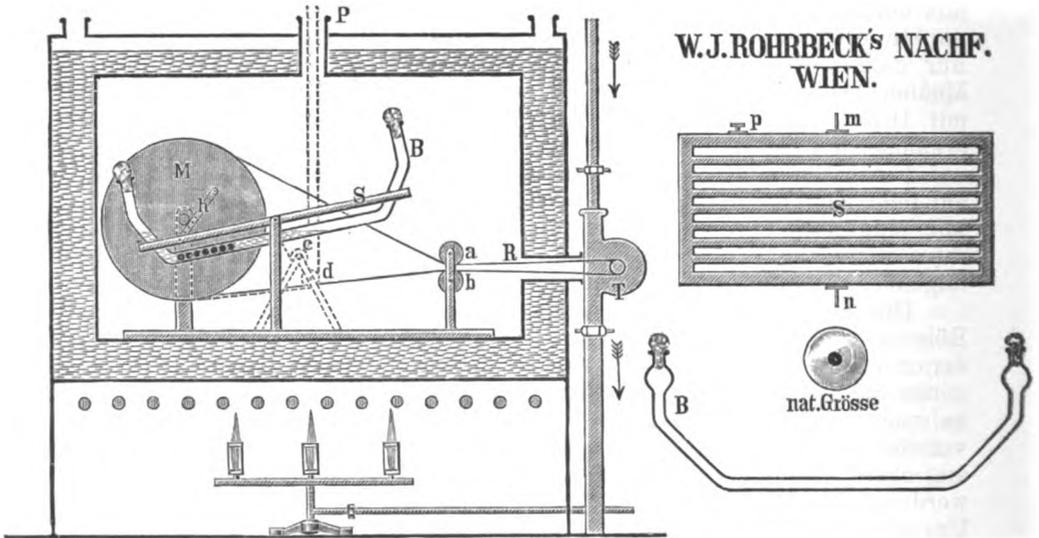
Bei diesem Apparat bleibt wohl die Flüssigkeit in fortwährender Bewegung, doch schien mir der Luftzutritt ein ungenügender. Gelegentlich der Blutuntersuchungen bei höheren Temperaturen, welche ich vor einiger Zeit vornahm¹⁾, bemerkte ich, welchen bedeutenden Einfluß auf den Zerfall der roten Blutkörper das zeitweise Schütteln der Flüssigkeiten hat, in welchem dieselben suspendiert sind. Man muß hierbei sehr darauf achten, daß nicht zu derb geschüttelt werde, damit nicht eine geradezu mechanische Schädigung der Blutkörperchen erfolge. Es war daher wünschenswert, einen Apparat zu konstruieren, welcher die Flüssigkeit in gleichmäßiger, ruhiger und anhaltender Bewegung erhielt.

Der im folgenden zu beschreibende, von der Firma F. W. Rohrbecks Nachf. in Wien hergestellte Apparat schien nach mehrfachen Versuchen dem gewünschten Zweck zu entsprechen.

Auf einem festen Gestell ist ein Rost angebracht, welcher seitlich und

1) Wien. klin. Wochenschr. 1902. No. 26.

von oben gesehen abgebildet ist (*S*). Derselbe ist um die Achse *mn* drehbar und an einer Seite mit der Schraube *p* versehen, mittelst welcher der Rost durch den Hebel *h* mit der Drehscheibe *M* verbunden wird. Diese Drehscheibe wird mit Hilfe einer dünnen Rebschnur oder einer starken Darmsaite, welche über die Rollen *aa* durch die Oeffnung *R* zur Turbine *T* führt, von dieser letzteren in Bewegung gesetzt. Die Turbine wird an die Wasserleitung angeschlossen.



Wird nun der Hahn der Wasserleitung vorsichtig geöffnet, so wird das durch die Turbine strömende Wasser mit Hilfe der Rebschnur oder der Darmsaite die Scheibe *M* und diese wieder durch den Hebel *h* den Rost *S* in Bewegung setzen, so daß sich derselbe, je nachdem der Hebel *h* kürzer oder länger ist — er ist durch die Schraube *p* verstellbar — in einem größeren oder kleineren Winkel auf und ab bewegen wird.

In den Rost werden nun die mit der Nährflüssigkeit bzw. dem Infektionsmaterial beschickten Röhrchen *B*, von welchem im ganzen 6 Platz finden, wie auf der Zeichnung ersichtlich, eingeschoben, und wenn der Apparat in Tätigkeit ist, ein einem Winkel von 25—35° auf und ab bewegt. Einige in den Glasröhren befindliche durchbohrte Glas- oder Aluminiumkugeln (eine solche ist in natürlicher Größe abgebildet), befördern die Durchmischung der Flüssigkeit, da sie in den Röhren fortwährend auf und ab gleiten.

Es ist darauf zu achten, daß sich der Rost nicht zu schnell bewege. Einmalige Auf- oder Abwärtsbewegung in 1½ Sekunden dürfte diejenige Zeitdauer sein, während welcher die Flüssigkeit sich vollkommen am abhängigen Ende der Röhre sammeln kann. Durch dieses ziemlich rasche, vollständige Ablaufen derselben wird die Luft in derjenigen Partie der Röhre, aus welcher die Flüssigkeit abgelaufen ist, verdünnt, und muß nun durch den nicht allzudicht hineingesteckten Wattepfropfen Luft in die Röhre gelangen, welche sich mit der nunmehr durch Bewegung des Apparates in diese Partie der Röhre gelangenden Flüssigkeit mischt, während auf der anderen Seite sich dasselbe wiederholt. So

wird die Flüssigkeit fortwährend mit erneuerten filtrierten Luftmengen in Berührung gebracht, wozu die innige Durchmischung durch die durchbohrten Kugeln erheblich beiträgt. Die Röhren haben eine innere Lichte von ungefähr 8 mm und sind 2mal abgebogen, wodurch die Flüssigkeitsmenge — gewöhnlich 20 ccm — selbst bei etwas rascherer Bewegung niemals bis an die Wattepfropfen gelangen kann. Nur für stark schäumende Flüssigkeiten sind Röhren nach Art der gesondert abgebildeten, zu wählen, bei welchen der Schaum zerfließt, sobald er bis an die unterhalb der Mündung der Röhren befindlichen kugligen Erweiterungen gelangt.

Die gestrichelten Linien bedeuten eine Abänderung in der Bewegungsvorrichtung, falls man die seitliche Durchbohrung des Thermostaten vermeiden will. In diesem Falle bringt man die Turbine oberhalb der Oeffnung *P* an und läßt die Rebschnur oder die Darmsaiten um die Rollen *c* und *d* laufen.

Besondere Vorsicht ist bei Beschickung der Röhren mit der infizierten Flüssigkeit geboten. Es ist häufig (besonders bei den ersten Versuchen) aufgefallen, daß sonst steril scheinende Bouillon, in welcher das ausgesäte Material unter gewöhnlichen Umständen in Reinkultur wuchs, wenn in den Apparat gebracht, schon nach einer wenige Stunden dauernden Bewegung Verunreinigungen zeigte. Diese können entweder durch schon in der Bouillon enthalten gewesene, besonders oxyphile Keime verursacht sein, welche in Eprouvetten in üblicher Weise in Bouillon gezüchtet, gar nicht zur Entwicklung kommen, oder es sind, natürlich wieder oxyphile Luftkeime, welche bei Oeffnen der Glasröhren, d. h. bei zeitweiliger, wenn auch noch so kurz dauernder Entfernung des Wattepfropfens, aus der Luft in die Röhren gelangen und dort durch rasche Entwicklung das Aussaatmaterial alsbald überwuchern.

Peinliche Sterilisation der in Gebrauch kommenden Nährflüssigkeiten und auch der Röhren selbst, sehr kurz dauernde Entfernung des Wattepfropfens bei Beschickung mit dem Aussaatmaterial unter möglichster Vermeidung des Eindringens von Luftkeimen wird daher zu beachten sein.

Indes kommen schon nach kurzer Uebung kaum mehr Verunreinigungen vor und kann man aus den bisherigen Erfahrungen und Versuchen, welche nach jeder Richtung fortgesetzt werden, entnehmen, daß besonders oxyphile Bakterien eine um das Vielfache schnellere Entwicklung zeigen, als nach den bisherigen Methoden, so daß sich diese besonders zur Herstellung von Massenkulturen solcher Bakterien eignet. Nur ist die Zeitdauer, während welcher die Bakterien bewegt werden sollen, nicht für alle Arten gleich; bei besonders rascher Vermehrung darf die Bewegung sogar nicht zu lange dauern, da die üppig wachsenden Bakterien alsbald, wie es scheint, die vorhandenen Nährstoffe verbrauchen und nunmehr ein direktes Hemmnis für die weitere Entwicklung bilden.

Mit Hilfe dieser Methode werden Milzbrandbakterien in 1—2 Tagen versport. Frische Tuberkelbacillen zeigen nach 2 Tagen beträchtliche Vermehrung und zeigt sich bei allen aeroben Bakterien, wie bereits bemerkt, je nach dem Grade des Sauerstoffbedürfnisses mehr oder weniger rasche Vermehrung. Ueber diese Versuche sowie über die Wiederholung der Blutuntersuchungen bei höheren Temperaturen¹⁾ unter Anwendung des hier beschriebenen Apparates wird anderen Orts berichtet werden.

1) l. c.

Nachdruck verboten.

Zur Züchtung der anaëroben Bakterien.

[Aus dem path.-anat. Institute zu Helsingfors.]

Von Dr. med. Osw. Streng.

Mit 4 Figuren.

In ihrer Publikation „Beiträge zur Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen“ heben Weichselbaum, Ghon und Sachs¹⁾ hinsichtlich der Methode, die anaëroben Bakterien in hohen Schichten zu züchten, hervor, daß diese gewisse Nachteile habe. „Bei dieser Methode erscheint die unmittelbare mikroskopische Betrachtung der Kolonien ausgeschlossen.“ Sie heben ferner hervor, daß diesem Nachteile teilweise abgeholfen werden könne, „nach dem Vorgange von Burri, der die Agarsäule in parallele Scheiben zerlegt und diese mikroskopiert.“

Ich habe mich seit einiger Zeit mit anaëroben Bakterien beschäftigt und dabei auch die Methode, anaëroben Bakterien in hohen Schichten zu züchten, angewandt. Um den von Weichselbaum, Ghon und Sachs

hervorgehobenen Nachteil zu vermeiden, bin ich so verfahren, daß ich anstatt der gewöhnlichen runden Reagenzgläser abgeplattete Reagenzgläser von beifolgender Form (Fig. 1) benutzt habe. Die Gläser sind also an der Mündung in einer Ausdehnung von ca. 2 cm den runden Reagenzgläsern vollkommen ähnlich, sind jedoch im übrigen abgeplattet. Solche Röhren, die mir zu einem Preis von 20 Pfg. das Stück von C. Zeiss, Berlin, angefertigt worden sind, gestatten eine vollständige mikroskopische Prüfung der verschiedenen Kolonien. Bei experimentellen Arbeiten, wo es gilt, rasch und leicht die Reinheit einer Probe zu mustern, bieten solche Röhren einen recht merkbaren Vorteil vor den gewöhnlichen runden dar.

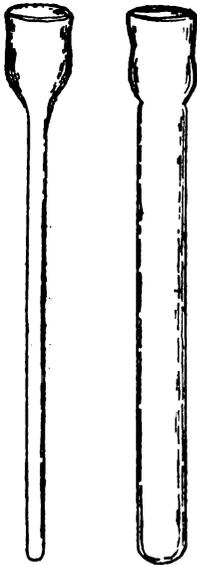


Fig. 1.

Dagegen sind in ihrer ganzen Ausdehnung abgeplattete Röhren aus dem Grunde ungeeignet, daß das Öffnen und Schließen derselben mit Watterpfropfen äußerst unbequem und schwer zu hantieren ist. Die von mir benutzten platten Reagenzgläser sind ebenso leicht zu öffnen und zu schließen wie die runden, und sind sehr bequem, z. B. bei der Ueberimpfung, zu hantieren, was bei der Anlegung

von einer größeren Anzahl Kulturen eine notwendige Bedingung für die Anwendbarkeit der Röhren ist. Durch Schleifen der platten Seiten der Röhren könnte vielleicht dieselbe Reagenzglasform auch beim Photographieren anaërober Bakterienkolonien gebraucht werden.

Um beim Anlegen von Plattenkulturen bequem von der ganzen platten Fläche zugängliche Kolonien zu erhalten, bin ich auf folgende Weise verfahren: In eine gewöhnliche hohe Petrischale, deren Kante ca. 2 cm oder etwas mehr mißt, gieße ich die nötige Menge einer in

1) Weichselbaum, Ghon u. Sachs, Centralbl. f. Bakt. u. Parasit. 1902.

gewöhnlicher Weise mit anaëroben Bakterien infizierten verflüssigten Traubenzucker-Agarkultur. Die Schale muß auf einer kalten Unterlage stehen, damit der Agar so schnell wie möglich erstarrt. Dies geschieht auch in einigen Sekunden. Eine Luftinfektion wird während des Steifwerdens des Agar durch den Deckel verhütet. Sobald dieser bakterienenthaltende Agar steif geworden, gieße ich darüber sterilen Traubenzuckeragar und drückte auf diesen Agar, bevor er steif geworden, einen nach meiner Anweisung verfertigten Glasdeckel von dem Aussehen, das die Figur 2 bezeichnet, bis die Kante des Deckels die Petrikannte berührt. Der verflüssigte sterile Agar war dabei zwischen die Seitenwand der Petrischale und der Deckelschale gepreßt, um in dieser Lage steif zu werden. Die anaëroben Bakterien enthaltende Bodenschicht wird also an den Seiten von einer fast 2 cm hohen Agarschicht geschützt. Um zu den zentralen Teilen der Bakterien enthaltenden Schicht zu dringen, hat der Sauerstoff der Luft also einen Weg von gegen 6—7 cm, d. h. 2 cm der Radie der Deckelschale durch Traubenzuckeragar zu passieren, eine Schicht, die sogar für empfindliche anaëroben Bakterien genügend sein dürfte. Will man noch fernerhin die Kulturen vor dem Eindringen des Sauerstoffes schützen, so stülpt man die Schale um, sobald der Agar steif geworden, und gießt steriles Paraffin, das bei ca. 50° C schmilzt, in die gebogene Kante des Deckels. Die darunterliegende Petrischale muß so hohe Kanten haben, daß bei vollständig festgedrücktem Deckel der Boden der Petrischale und derjenige des Deckels in einer Entfernung von ca. 4—5 mm voneinander stehen, mit anderen Worten, der Deckel darf nicht so tief herabsinken, daß er direkt das Bakterien enthaltende Lager berührt, sondern von dieser Schicht durch ein wenigstens 2—3 mm dickes, steriles Lager getrennt ist.



Fig. 2.

Mit dergleichen Plattenkulturen, die auch ohne Öffnen der Schale eine mikroskopische Prüfung der verschiedenen Kolonien speziell von der unteren Seite gestatten, habe ich die obligat anaëroben *B. anthracis* sympt., *B. oedematis* malign., *B. botulinus* gezüchtet.

Durch einige wenige Verdünnungen kann man natürlich auch vereinzelte Kolonien in der Plattenkultur erhalten.

Dank der sterilen schützenden Agarschicht zwischen dem Deckel und dem bakterienführenden Lager, ist es in den meisten Fällen möglich, auch nachdem die Kultur mehrere Tage in Thermostaten gestanden, den Deckel durch eine allmähliche umdrehende Bewegung aufzuheben, ohne daß die unterliegende, Bakterien enthaltende Schicht und die einzelnen Kolonien in ihrer Lage gestört werden; die ganze nunmehr freie Agarfläche, durch welche die Kolonien herausgenommen werden sollen, ist nicht infiziert, wie es dagegen meistens der Fall ist z. B. bei dem Verfahren von Koch¹⁾, Sanfelice²⁾, Trenkmann³⁾. Sollte sich jedoch der Deckel nicht ohne weiteres leicht lösen lassen, was allerdings eintreffen kann, besonders wenn die Schale längere Zeit in Thermostaten gestanden, so erhitze ich den

1) Koch, Deutsche med. Wochenschr. 1884.

2) Sanfelice, Zeitschr. f. Hyg.

3) Trenkmann, Centralbl. f. Bakt. u. Paras. 1902.

Deckel vorsichtig von oben mittels einer Gasflamme so lange, bis die oberste Schicht des dem Deckel zunächstliegenden sterilen Agarlagers erwärmt ist. Alsdann löst sich die Deckelschale leicht ab, ohne daß die die Bakterien enthaltende Schicht irgendwie von ihrem Platze verschoben wird. Die auf diese Weise freigelegte Fläche ist steril und frei von Verunreinigungen. Durch das 2—3 mm dicke sterile Agarlager können die verschiedenen Kolonien mit Leichtigkeit herausgenommen und behufs weiterer Untersuchung übergeführt werden. Sobald man die zu untersuchenden Kolonien mit der Kapillarpipette oder Platinnadel herausgenommen hat, wird wieder steriles Agar über das Ganze gegossen. Der Deckel, der während der Isolierungszeit mit Vorteil vor der Luftinfektion unter einer größeren, reinen Glasglocke geschützt werden kann, wird vorsichtig über einer Gasflamme erwärmt und dann wieder auf seinen vorigen Platz gedrückt. Die neuzugessene sterile Schicht füllt etwa entstandene Risse und anderes aus, und wird, wie vorhin, wieder zwischen der Bodenschale und dem Deckel emporgedrückt, wird steif und schützt wieder die Kultur vor der Einwirkung des Sauerstoffes. Eine solche Manipulation läßt sich viele Mal wiederholen, so daß bei einem im übrigen aseptischen Verfahren die Entwicklung der verschiedenen Kolonien während einer längeren Zeit betrachtet werden kann, ohne daß die Anaërobiose aufgehoben würde. Eine äußerst sorgfältige Asepsis ist jedoch dringend nötig.

Ich habe früher diese Methode in ihrer ersten Form veröffentlicht¹⁾. Anstatt gewöhnlicher Petrischalen als Bodenschale gebrauchte ich Bodenschalen, die mit einer zirkelförmigen erhabenen Leiste am Boden versehen waren. Diese Leiste teilte also den Boden in einen zentralen Teil und eine ringförmige Peripherie ein. In den inneren zentralen Teil wurde das infizierte Nährmedium eingeführt (s. Fig. 3 u. 4). Im



Fig. 3.



Fig. 4.

übrigen verfuhr ich in ebenbeschriebener Weise. Die Deckelschale wurde bis zu der erwähnten ringförmig erhöhten Kante eingedrückt und ruhte auf derselben. Diese Kante hat sich jedoch als unnötig erwiesen, wenigstens für diejenigen Bakterien, mit welchen ich gearbeitet habe; der Sauerstoff dringt so langsam unter dem Deckel ein, daß ich nunmehr als Bodenschale eine gewöhnliche Petrischale benutze. Ein Verfahren, das außerdem den Vorteil hat, daß dieselbe Schalenform nicht nur für anaërobe Bakterien, sondern natürlich auch für aëroben Plattenkulturen benutzt werden kann. Um empfindlichere Anaërobearten zu züchten, wären doch vielleicht die mit einer Leiste versehenen Bodenschalen zu benutzen.

Die oben erwähnten Deckelschalen sind mir zu einem Preis von 50 Pfg. pro Stück von C. Desaga in Heidelberg angefertigt worden, die Bodenschalen mit Leiste ebenso von C. Desaga zu demselben Preise, 50 Pfg. pro Stück.

1) Duodecim 1903. Anaerobisestī kasvavien bakteerien viljelijemisestā (Die Züchtung der anaëroben Bakterien.)

Bevor ich diese kurze Mitteilung schließe, will ich noch mit einigen Worten die von Weichselbaum¹⁾ angegebene sinnreiche Gefriermethode erwähnen, die ich als besonders geeignet für die Züchtung anaërober Bakterien in fließendem Nährmedium gefunden habe. Doch bin ich insofern von seiner Beschreibung abgewichen, daß ich die Bouillon habe frieren lassen, bevor ich die Bakterien eingeführt und mit Agar überschichtet habe. Erst als die Proberöhre so vorbereitet war, habe ich die Bakterien der Bouillon mittels Kapillarpipette eingeimpft. Auf diese Weise könnte der eventuell störende Einfluß, den ein Einfrieren der Bakterien vielleicht ausübt, vermieden werden. Den oft von mir beobachteten Mißständen, daß die schützende Agarsäule leicht in der Bouillon herabsinkt, könnten ja durch die Anwendung der von Rivas²⁾ vorgeschlagenen Reagenzgläser abgeholfen werden.

Nachdruck verboten.

Ueber das Verhalten des Loefflerschen Mäusetypusbacillus zu dem v. Drigalski-Conradischen Nährboden.

[Aus dem Institute für Hygiene und experimentelle Therapie in Marburg. Abteilung für Hygiene. Vorstand: Prof. Bonhoff.]

Von Dr. phil. C. Siebert in Marburg.

Zahlreiche Mißerfolge, welche mir bei der praktischen Verwertung des Loefflerschen Mäusetypusbacillus zur Vertilgung der Haus- und Feldmäuse bekannt geworden waren, veranlaßten mich, den Versuch zu machen, die Virulenz der Kulturen dadurch zu steigern, daß ich dieselben Mäusen subkutan oder per os reichte und aus Darm und Organen der verendeten Tiere durch Ausstriche auf Agar neue Reinkulturen herstellte. Dabei zeigte sich die Schwierigkeit, daß die Mäusetypusbacillen nur durch ein langwieriges Verfahren als solche erkannt und von den Coli-Arten getrennt werden konnten. Es mußte immer eine große Anzahl Kolonien von den Platten abgeimpft und auf ihre Identität mit dem Mäusetypusbacillus untersucht werden.

Später habe ich deshalb, einem mir von Herrn Prof. Bonhoff freundlichst gegebenen Rate folgend, den v. Drigalski-Conradischen Nährboden zur Isolierung der Reinkulturen mit gutem Erfolge benutzt.

Da bisher über das Verhalten des Mäusetypusbacillus zu dem genannten Nährboden noch nichts veröffentlicht ist, will ich in nachfolgendem unsere auf diesem Gebiete gemachten Beobachtungen mitteilen.

Ich schicke voraus, daß meine Erwartung, durch wiederholte Tierpassage virulentere Kulturen zu erhalten, bisher nicht erfüllt wurde, hoffe aber, daß es gelingen wird, auf anderem Wege das Ziel zu erreichen und werde hierauf später zurückkommen.

Als Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen dienten uns drei verschiedene Mäusetypuskulturen, von denen I im Juni 1902, II und III im März 1903 bezogen wurden.

1) l. c.

2) Rivas, Centralbl. f. Bakt. u. Parasit. 1902.

Die Eigenschaften dieser drei Kulturen habe ich in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

	I	II	III
Im hängenden Tropfen (24-stündige Kultur)	Lebhaft bewegliche Stäbchen, oft zu mehreren zusammenliegend. Meist kreisförmige Bewegung. Die Stäbchen drehen sich um den eigenen Mittelpunkt	Schnell durch das ganze Gesichtsfeld sich bewegende Stäbchen; nur wenige ruhig liegend	Wie II, aber oft in großer Zahl zusammenliegend
Agarplatten nach 24 Stund.	Weißlicher Ueberzug, bei durchfallendem Lichte bläulich. Mikroskopisch: Einzelne liegende, kaum gefärbte, glänzende Kolonien.	Wie I	Wie I
nach 48 Stund.	Makroskopisch: Wie tags zuvor. Mikroskopisch: Ueberzug über die ganze Platte, Kolonien fein granuliert	Wie I	Makroskopisch bei durchfallendem Lichte gelblich, sonst wie I
Gelatineplatten nach 24 Stund.	Tautropfenförmige Kolonien. Mikroskopisch: Teils auf der Oberfläche, teils tiefliegende Kolonien, scharf umrändert, fein granuliert.	Wie I	Wie I
nach 48 Stund.	Ueber die Oberfläche ausgebreitetes Häutchen	Wie I	Wie I
Wachstum auf Agar nach 20 Stund.	Runde Kolonien, teils einzeln, teils zusammenhängend, bei durchfallendem Lichte bläulich durchscheinend. Kondenswasser trübe, ohne Häutchen.	Gleichmäßiger Belag über die ganze Oberfläche. Färbung wie I	Wie I
nach 3 Tagen	Belag über die ganze Oberfläche, bläulich durchscheinend	Gelblich durchscheinend	Gelb, wenig durchscheinend
Gefärbtes Präparat	Gleichmäßig gefärbte Stäbchen, bei einzelnen Polfärbung. Durchmesser: 0,2—0,5 μ . Länge: 0,75—1 μ , wenige bis 1,5 μ	Wie I Durchmesser: 0,2—0,5 μ . Länge: 0,75—1,2 μ	Wie I. Durchmess.: 0,2, wenige 0,5 μ . Länge: 1,0, wenige bis 1,5 μ
Nach Gram	Nicht gefärbt	Wie I	Wie I
Stich in Gelatine	Wachstum dem Stiche entlang und auf der Oberfläche. Gelatine wird nicht verflüssigt	Wie I	Wie I
Wachstum auf Kartoffel Milch	Wie Typhus. Nach 8 Tagen im Aussehen nicht verändert. Keine Indolbildung	Wie I Wie I Wie I	Wie I Wie I Wie I
1-proz. Traubenzuckeragar	Lebhaft Gasentwicklung	Wie I	Wie I
1-proz. Mannitagar	„ „	Wie I	Wie I
1-proz. Milchzuckeragar	„ „	Wie I	Wie I

	I	II	III
1-proz. Rohr- zuckeragar	Weniger lebhaftere Gasentwic- kung	Wie I	Wie I
1-proz. Dextrin- agar	Keine Gasentwicklung	Schwache Gasent- wicklung	Keine Gasentwic- kung
1-proz. Trauben- zuckerbouillon nach 24 Stund. nach 48 Stund.	1 ccm braucht 2,2 ccm $\frac{1}{100}$ Normalkalilauge zur Neu- tralisation. 1 ccm braucht 2,6 ccm $\frac{1}{100}$ Normalkalilauge zur Neutralisation	1 ccm braucht 2,25 ccm $\frac{1}{100}$ Normal- kalilauge 1 ccm braucht 2,7 ccm $\frac{1}{100}$ Normalkali- lauge	1 ccm braucht 2,5 ccm $\frac{1}{100}$ Normal- kalilauge 1 ccm braucht 3,0 ccm $\frac{1}{100}$ Normal- kalilauge
Milchzucker- bouillon	Gibt nach 24 und 48 Stunden dieselbe Reaktion, wie ein steriles Kontrollröhrchen	Wie I	Wie I
Milchzucker- bouillon im Gär- ungskölbchen	Keine Gasbildung	Wie I	Wie I
v. Drigalski-Con- radischer Nährboden	Blaue Kolonien	Wie I	Wie I
Agglutination	9. Februar 1:2000, 1. April 1:600	1. April 1:600	1. April 1:2000

Im allgemeinen stimmen die drei Kulturen nach vorstehender Tabelle untereinander überein. Daß die Art der Bewegung der Stäbchen I eine andere ist als die der Kulturen II und III, hat vielleicht seinen Grund in der längeren Fortzucht auf künstlichem Nährboden.

Die drei Kulturen färben sich gleich gut mit Fuchsin, Gentanaviolett, Methylenblau und Bismarckbraun.

Da das Wachstum auf Kartoffel durch den Säuregehalt des Nährbodens beeinflußt wird, impfte ich zur Kontrolle dieselben Kartoffeln mit *Bacterium coli* und zwei verschiedenen Typhuskulturen. Letztere zeigten ein kaum sichtbares Wachstum, welches von dem der drei Mäusetyphuskulturen nicht zu unterscheiden war. *Bacterium coli* bildete starke Auflagerungen.

In Traubenzuckerbouillon wurde durch Titrieren mit $\frac{1}{100}$ Normalkalilauge Säurebildung nachgewiesen, nach 24-stündigem Wachstum bei 37° brauchte 1 ccm Traubenzuckerbouillon 2,2—2,5 ccm Lauge zur Sättigung, nach 48 Stunden 2,6—3,0 ccm. Die Säurebildung nimmt demnach nach Ablauf von 24 Stunden noch zu, wenn auch nur wenig.

In gleicher Weise beimpfte und behandelte Milchzuckerbouillon behielt, $\frac{1}{100}$ Normalkalilauge gegenüber, nach 24 und 48 Stunden denselben Titer wie ein steriles Kontrollröhrchen, es fand demnach keine Säurebildung statt.

Durch Stich geimpfter Traubenzucker-, Mannit- und Milchzuckeragar zeigte nach 24-stündigem Aufenthalte im Brütschranke durch Gasbildung veranlaßt, durch das ganze Röhrchen ausgedehnte Risse. Bei Rohr-
zuckeragar war die Einwirkung eine schwächere, auf Dextrinagar wirkte Kultur I und III gar nicht, Kultur II nur wenig gasbildend ein.

Die Prüfung der Kulturen auf ihr Verhalten gegen Milchzuckerbouillon im Gärungskölbchen ergab nach 3-tägigem Aufenthalte im Brüttschranke keine Gasentwicklung.

Es dürfte demnach die im Milchzuckeragarröhrchen beobachtete

Tabelle II.

No.	Gaben	Agglutination der Versuchswandten Kultur	Tod nach Tagen	Sektionsbefund	Kolonien auf v. Drigalski-Conradischem Nährboden					Agglutination der erhaltenen Kolonien	
					Darm	Herzblut	Milz	Leber	Niere	blanen Kolonien	roten Kolonien
No. 1	1/2 Graue Maus	1 : 2000	2	Darminhalt blutig, Geschwüre auf der Schleimhaut	Zahlreiche blaue, wenig rote	3 rötliche	mehrere rötliche			1 : 2000 + 1 : 3000 -	0
No. 2	desgl.	1 : 2000	3	Geschwüre auf der Darmschleimhaut	zahlreiche blaue und rote					1 : 200 -	0
No. 3	desgl.	1 : 200 nicht	nicht								
No. 4	desgl.		2	wie bei 2	blaue und rote					1 : 200 -	1 : 200 -
No. 5	desgl.		2	wie bei 2	desgl.					1 : 200 -	1 : 200 -
No. 6	desgl.		7	wie bei 2	blaue, rote und violette, blaue mit rotem Punkte					1 : 400 + 1 : 600 -	1 : 200 -
No. 7	desgl.		2	wie bei 2	blaue, violette, rote					1 : 200 -	1 : 200 -
No. 8	desgl.	1 : 2000	5	wie bei 2	blaue und rote					1 : 600 + 1 : 800 -	1 : 200 -
No. 9	desgl.	1 : 600	24	Darminhalt blutig, Geschwüre auf der Schleimhaut, Milz vergrößert	zahlreiche rote	steril	3 blaue	12 rote	1 blaue	1 : 200 -	1 : 200 -

Maus	Kultur aus Maus	1:2000	1	Ueschwure auf der Darm-schleimhaut	nur rote	nur blaue	nur blaue	1:200 + 1:400 -	0
No. 11	desgl.		1 1/2	Leber, Lunge der Maus 9	blaue und rote	steril	Farbe der Kolonien undeutlich	1:200 - 1:200 -	1:200 -
No. 12	desgl.	1:2000	7	Agarkultur Mäuse-typus I	zahlreiche blaue, 30 rote	19 blaue mit roten Punkten	9 blaue mit roten Punkten	1:200 - 1:200 -	steril
No. 13	desgl.	1:2000	1	1 Oese Mäuse-typus I	blaue und rote	blaue	blaue und rote	1:400 + 1:600 -	1:200 -
No. 14	desgl.		1	Milz und Leber der Maus 13	nur rote	steril	rote	0	1:200 -
No. 15	desgl.	1:400	1	1/3 Oese Kultur aus Maus 13	nur blaue	blaue	blaue	1:600 + 1:800 -	0
No. 16	desgl.	1:400	1	1/3 Oese Kultur aus Maus 13	blaue und rote	blaue mit roten Punkt	desgl.	1:600 + 1:800 -	1:200 -
No. 17	desgl.	1:400	2	1/3 Kultur aus Maus 13	desgl.	2 blaue	27 rote	1:400 + 1:600 -	1:200 -
No. 18	desgl.	1:600	4	1 Oese Kondens-wasser M.-T. II	viel blaue, weniger rote	nur blaue	nur blaue	1:200 + 1:400 -	1:200 -
No. 19	desgl.	1:2000	3	1 Oese Kondens-wasser M.-T. III	nur rote	desgl.	desgl.	1:500 + 1:600 -	0
No. 20	desgl.	1:600	6	1 Kultur M.-T. II	desgl.	blaue und rote	blaue und rote	1:200 -	1:200 -

	Gaben	Agglutination der Versuchswandten Kultur	Tod nach Tagen	Sektionsbefund	Kolonien auf v. Drigalski-Conradischem Nährboden					Agglutination der erhaltenen		
					Darm	Herzblut	Milz	Leber	Niere	blauen Kolonien	roten Kolonien	
No. 21	weiße Maus	1 Kultur M.-T. III	1	Darminhalt blutig, Milz vergrößert	blau	steril	blau	steril	steril	1:200	—	0
No. 22	desgl.	1 Kultur aus Maus 10	10	Darminhalt blutig, zum Teil schwarzlich, Milz vergrößert	zahlreiche blaue und rote	wenig blaue	zahlreiche blaue	zahlreiche blaue	wenig blaue	1:200	—	1:200
No. 23	desgl.	1 Kultur aus Maus 8	10	Darminhalt normal, Milz vergrößert	nur rote	blau und rote	nur blaue	zahlreiche blaue, 1 rote	nur blaue	1:400	+	1:200
No. 24	desgl.	1/2 Kultur M.-T. III	7	wie bei 23	blau und rote	rote und blaue	desgl.	zahlreiche blaue	blau und rote	1:500	+	1:200
No. 25	desgl.	1 Kultur aus Maus 16	7	Darminhalt blutig, Milz vergrößert	desgl.	blaue	blau	desgl.	desgl.	1:600	+	1:200
No. 26	graue Maus	1 Agarkultur III	11	Darminhalt wenig blutig, Milz vergrößert	desgl.	desgl.	blau und rote	blau	blau	1:200	+	1:200
No. 27	weiße Maus	1 Agarkultur aus Maus 6	nicht							1:400	+	1:200
No. 28	desgl.	1 Agarkultur aus Maus 9	nicht							1:600	—	—
No. 29	desgl.	1 Agarkultur aus Maus 17	19	keine Veränderung	zahlreiche blaue, wenig rote	1 blaue	12 blaue	2 blaue	steril	1:400	+	1:200
No. 30	desgl.	1 Agarkultur aus Maus 15	22	Darminhalt wenig blutig, Milz und Leber mit einzelnen dunklen Flecken	wenig rote	steril	3 blaue	2 rote	steril	1:200	—	1:200
No. 31	desgl.	Milz der Maus 15	nicht									

Gasbildung auf Umsetzung anderer, in Agar-Agar vorher vorhandener Stoffe zurückzuführen sein.

Der zum Versuche verwandte Traubenzucker-, Mannit-, Rohrzucker- und Dextrinagar wurde aus einem anderen Nähragar als der Milchzuckeragar bereitet. Bei diesen Versuchen ist die Gasbildung durch das Vorhandensein der Kohlehydrate bedingt, denn wenn der Nähragar an sich vergärungsfähige Stoffe enthalten hätte, so würde auch im Dextrinagar in allen Fällen Gasbildung aufgetreten sein.

Ein Vergleich der in Tabelle I zusammengestellten Eigenschaften der drei Mäusetyphuskulturen mit dem von Loeffler (1) über seinen M.T.-Bacillus Gesagten ergibt im allgemeinen Uebereinstimmung. Nur das Wachstum auf Kartoffel ist ein anderes. Diese Verschiedenheit erscheint nicht wesentlich, da sie durch verschiedenen Säuregehalt des Nährbodens veranlaßt sein kann.

Von Lasers (2) Bacillus unterscheiden sich unsere drei Kulturen ebenfalls durch das verschiedene Wachstum auf Kartoffel, ferner dadurch, daß sich Lasers Bacillus nach Gram färbt.

v. Drigalski-Conradi (3) machen in ihrer ersten Veröffentlichung über den neuen Nährboden darauf aufmerksam, daß neben Bac. typhi auf dem Nährboden in blauen Kolonien wachsen: Bakterien der Subtilis- und Proteus-Gruppe, sowie Bacilli fluorescentes und Bac. faecalis alcaligenes.

Später hat Kayser (4) verschiedene Repräsentanten der Gruppe von Bakterien, denen Indolbildung abgeht, die dabei Traubenzucker vergären und Milch nicht zum Gerinnen bringen, auf ihr Verhalten dem v. Drigalski-Nährboden gegenüber geprüft und gefunden, daß folgende Arten blaue Kolonien bilden: Drei Paratyphusarten, Bacterium paracoli gasoformans, B. bovis morbificans, B. enteritidis, B. Friedebergensis, B. Breslaviensis.

Um festzustellen, ob es gelingt, mit Hilfe des v. Drigalski-Conradischen Nährbodens¹⁾ den M.T.-Bacillus zu isolieren, wurde in folgender Weise verfahren:

Die Kulturen wurden grauen und weißen Hausmäusen per os oder subkutan gereicht. Dann wurden aus dem Darne und den Organen der infolge der Infektion eingegangenen Mäuse Reinkulturen des Mäusetyphus isoliert und Mäusen wieder subkutan oder per os gegeben. Ferner wurden einigemal Darm oder Organe der verendeten Mäuse weiter verfüttert.

Nach dem Tode der Tiere wurden bei Beginn dieser Arbeit nur aus dem Darne, später aus Darm, Herzblut, Milz, Leber und Niere, in der von v. Drigalski-Conradi angegebenen Weise Ausstriche auf den Nährboden gemacht. Häufig konnten schon nach 12 Stunden charakteristische Kolonien beobachtet werden. Die folgenden Angaben beziehen sich auf 24-stündige Kulturen. Nach Farbe und Größe waren folgende Kolonien zu unterscheiden:

- 1) Blaue, violette und rote Kolonien von einem Durchmesser von 1—5 mm, deren mikroskopische Untersuchung Stäbchen ergab.
- 2) Blaue Kolonien mit einem roten oder violetten Punkte in der Mitte, Durchmesser 2—5 mm. Diese bestanden teils aus Stäbchen, teils waren es Mischkolonien von Stäbchen und Kokken, die später in Reinkulturen erhalten wurden.

1) Der v. Drigalski-Conradische Nährboden wurde in der bakteriologischen Abteilung der Firma Dr. Siebert & Dr. Ziegenbein, Marburg, hergestellt.

3) Kleine blaue und rote Kolonien, Durchmesser 0,5—1 mm, die durch Kokken gebildet waren.

In einzelnen Fällen war es schwer, den Farbenton mit Sicherheit festzustellen. Ich habe dann mit der Nadel die betreffende Kolonie in Form eines Striches auf neuen Drigalski-Nährboden übertragen und erzielte hierdurch stets schon nach 12 Stunden bei Mäusetypus deutlich blaue und bei Coli-Arten deutlich rote Färbung. Kokken zeigten im allgemeinen langsames Wachstum. Von den verschiedenen Kolonien wurden einige auf Agar gebracht und nach mehrmaligem Ueberimpfen durch die Agglutinationsprobe weiter untersucht.

(Schluß folgt.)

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Ein-sendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Inhalt.

- Bail, Oskar u. Pettersson, Alfred**, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. (Schluß.), p. 540.
- Bongert, J.**, Beiträge zur Biologie des Milzbrandbacillus und sein Nachweis im Kadaver der großen Haustiere, p. 497.
- Bosc, F. J.**, Les Epithéliomas parasitaires. La clavelée et l'Epithélioma claveloux. (Forts.), p. 517.
- Ghon, Anton u. Sachs, Milan**, Beiträge zur Kenntnis der anaeroben Bakterien des Menschen. (Forts.), p. 481.
- Hersog, H.**, Die Abschwächung der Säugtiertuberkulosebacillen im Kaltblüterorganismus, p. 535.
- Hetsch, H.**, Weiteres zur kulturellen Differenzierung der Ruhrbacillen gegenüber ruhrähnlichen Bakterien, p. 580.
- Hirschbruch und Schwer**, Die Cholera-diagnose mit Hilfe eines Spezialagars, p. 585.
- Ito, Sukehito**, Ueber die Aetiologie von „Ekiri“, einer eigentümlichen, sehr akuten, ruhrartigen, epidemischen Kinderkrankheit in Japan, p. 509.
- Kraus, Rudolf**, Ueber ein akut wirkendes Bakterientoxin, p. 488.
- v. Linstow**, Helminthologische Beobachtungen, p. 526.
- Meyer, Arthur**, Naphтолblau als Reagens auf Bakterienfett, p. 578.
- Moser, Paul u. Frh. v. Pirquet, Clemens**, Zur Agglutination der Streptokokken, p. 560.
- Müller, Paul Theodor**, Zur Theorie der natürlichen antibakteriellen Immunität. (Forts.), p. 550.
- —, Geht das Tetanolyisin mit den Proteiden des Serums und des Eiklars eine ungiftige Verbindung ein?, p. 567.
- Obermaier, Gust.**, Ueber die Trinkwasserdesinfektion mit Jod nach Vaillard, p. 592.
- Pick, E. F.**, Ueber den Gehalt der einzelnen Eiweißfraktionen des Serums an Cholerainmunkörpern, p. 556.
- Pieri, Gino**, Kurze Erwiderung auf Herrn Dr. Looss' Mitteilung: Weiteres über die Einwanderung der Ankylostomen von der Haut aus, p. 531.
- Sauerbeck, Ernst**, Zur Frage des Pankreas-Cytolysins, p. 573.
- Siebert, C.**, Ueber das Verhalten des Loefflerschen Mäusetypusbacillus zu dem v. Drigalski-Conradischen Nährboden, p. 601.
- Streng, Osw.**, Zur Züchtung der anaeroben Bakterien, p. 598.
- Vagedes**, Zur Abhandlung von Krompecher und Zimmermann „Ueber die Virulenz der Tuberkelbacillen“ in No. 8 dieser Zeitschrift, p. 507.
- Wiener, E.**, Ein Apparat zur Züchtung von Mikroorganismen in beweglichen flüssigen Medien, p. 594.
- Wolf, Alfred**, Bemerkungen zu vorstehender Entgegnung, p. 557.

Erklärung der Figuren

zur Tafel Herzog, Abschwächung der Säugetiertuberkulosebacillen im Kaltblüterorganismus (dieses Centralbl. No. 6).

Figur 1.

Ausstrichpräparat der von Dieudonné gezüchteten Reinkultur (nach zweimaliger Durchleitung durch den Kaltblüter). Vergrößerung 1500:1.

Figur 2.

Schnitt durch die Milz von Frosch 7. (Färbung mit Karbolfuchsin „Ziehl-Nelsen“, ohne Kontrastfarbe.) Vergrößerung 1500:1.

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen.

[Aus dem pathologisch-anatomischen Institute in Wien
(Prof. Dr. A. Weichselbaum).]

II. Zur Aetiologie des Gasbrandes.

Von Dr. Anton Ghon und Dr. Milan Sachs.

(Erster Teil.)

Mit 3 Tafeln.

(Schluß.)

IV. Tauben (= T).

An Tauben wurden Versuche mit subkutaner und intramuskulärer Injektion ausgeführt.

Während die subkutane Injektion von 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur in einem Versuche (Injektionsstelle: Brust) nur ein flaches Geschwür im Bereiche der Injektionsstelle hervorrief, welches glatt ausheilte, bewirkte in einem zweiten Versuche, in dem ein Flügel zur Injektion benutzt wurde, die Injektion derselben Menge bereits nach 48 Stunden den Tod der Taube unter Gasbildung und starker ödematöser Anschwellung des Flügels.

Die intramuskuläre Injektion (Brustmuskel) hatte bei Verwendung größerer Mengen (1—2 ccm) stets den Tod des Tieres innerhalb der ersten 20 Stunden zur Folge. Die Veränderungen, die vorwiegend lokale waren, bestanden hauptsächlich in ausgedehnter Gasbildung in dem betreffenden Muskel, der zugleich stärker durchfeuchtet und stellenweise von Blutungen durchsetzt war. Eine Taube, die nur 0,5 ccm der gleichen Zuckergelatinekultur intramuskulär bekam, zeigte keinerlei Erscheinungen.

T 5, am 31. Mai 1902 subkutan (linke Brustseite) 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 20.

Am nächsten Tage diffuses, feines Knistern im Unterhautbindegewebe der linken Brustseite. Am 7. Juni findet sich, entsprechend der Injektionsstelle, ein ca. 2 cm im Durchmesser haltender, seichter Substanzverlust mit unregelmäßigem, verdicktem Rande und trockenem Grunde, auf dem stellenweise eine trockene, schwarzrote Kruste haftet. Dieser Substanzverlust reicht über das Brustbein auf die andere Seite. Vollständige Heilung des Geschwüres.

T 4, am 30. Mai 1902 subkutan (linker Flügel) 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 20.

Der linke Flügel schwillt im Laufe des nächsten und zweitnächsten Tages an, beim Betasten Knistern nachweisbar. Die Taube auffallend matt.

Tod nach 48 Stunden.

Sektion, 15 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis):

Der linke Flügel angeschwollen, in seinem Bereiche sind überall kleine Gasbläschen, durch die Haut durchschimmernd, zu sehen; auf Druck, namentlich der Brust zu, deutliches Knistern. Haut und Unterhautbindegewebe von einer gelblich-rötlichen Flüssigkeit durchtränkt. Die Muskulatur des Flügels stark durchfeuchtet, wie fleckig aussehend, indem einzelne Partien blässer, andere stärker gerötet erscheinen, das Bindegewebe zwischen den Muskelgruppen reichlich von gelblich-rötlicher Flüssigkeit durchsetzt. Der linke, große Brustmuskel etwas feuchter und auffallend blaß dem der anderen Seite gegenüber. Leber groß, fast zerfließend weich, gleichmäßig rötlich-braun-

gelb. Milz vergrößert, weich, lichtrot. Nieren weich, lichtbraungelb. Lungen leicht hyperämisch. Herz fast leer.

Deckglaspräparate: 1) vom Flügel: Reichlich Bacillen, vorwiegend Gram-positiv, mittelstark, kürzer und länger, Fäden, wenig angeschwollene Formen. Keine sicheren Sporen. Im Jodpräparate ziemlich reichliche, verschieden intensive Braunfärbung, gleichmäßig oder fleckig.

2) Vom Lebersafte: Keine Bakterien.

Kulturen: 1) Vom Flügel: a) Aërob: Steril. b) Anaërob: Wachstum (Reinkultur).

2) Vom Herzblute: Anaërob: Steril.

Histologischer Befund:

1) Schnitt durch den Flügel, nahe dem ersten Gelenke: Cutis und subkutanes Bindegewebe von reichlichsten Mengen homogen aussehender Massen durchsetzt, stellenweise kernlos, stellenweise wieder mit Anhäufungen von rundlichen, ein- und mehrkernigen Zellen und spärlichen roten Blutkörperchen. Im subkutanen Gewebe auch größere und kleinere, unregelmäßig begrenzte, rundliche und längliche Hohlräume. Im interstitiellen Bindegewebe der oberflächlichen Muskelschichten reichlich homogene, rötlich (Eosin) gefärbte Massen und dichte Zellhaufen, die teils aus kleineren ein- und mehrkernigen, rundlichen Zellen bestehen, teils aus größeren mit bläschenförmigem, schwach tingiertem Kern und breitem Protoplasmasaum.

Die Zellkerne zeigen vielfach Zerfall. Die Muskelfasern der Umgebung sind streckenweise völlig kernlos und in Zerfall begriffen. In den tieferen Muskelpartien nimmt die Zellinfiltration mehr und mehr ab.

Bakterien finden sich sehr reichlich im subkutanen Bindegewebe, während zwischen den Muskelfasern und in den obersten Schichten solche spärlich oder gar vereinzelt nachweisbar sind. Die Bakterien stellen Gram-positive Bacillen einer Art dar, vielfach zu kürzeren Fäden auswachsend.

2) Linker Brustmuskel ohne besondere Veränderungen.

3) Milz, Leber und Niere zeigen in Schnitten keine Bakterien.

T 2, am 22. Mai 1902 intramuskulär (rechter großer Brustmuskel) 1 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 16.

17 Stunden nach der Injektion im Bereiche des rechten großen Brustmuskels deutliches Knistern.

Tod nach 20 Stunden.

Sektion, 2 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis):

Der rechte Brustmuskel etwas voluminöser, läßt deutlich Knistern nachweisen. Der bloßpräparierte Muskel in seiner Farbe von dem der anderen Seite nicht verschieden. Auf dem Durchschnitte zeigt sich der oberflächliche von dem tiefen Brustmuskel abgehoben; die Fascie zwischen beiden gelblich-schmierig, läßt in mäßig reichlicher Menge eine wie nekrotisch aussehende, von Gasblasen durchsetzte Masse abstreifen. Die äußeren unteren Partien des großen Brustmuskels in einem ca. haselnußgroßen Bezirke dunkelschwarzrot gefärbt und von kleinen, bis etwa stecknadelkopfgroßen Gasblasen durchsetzt. Leber braunrot. Nieren gelbbraun. Milz nicht vergrößert. Lungen blaß.

Deckglaspräparate: Reichlich Gram-positive Bacillen, sehr reichlich angeschwollene, fast rundliche Gebilde oder Keulenformen, seltener schmalere und leichtere Formen. Spärlich Gram-negative und Uebergangsformen. In Jodpräparaten sehr reichlich gleichmäßige oder fleckige Braunfärbung und auffallend reichlich sehr dunkle, schwärzliche, schmutzig aussehende Einlagerungen. Spärlich endogene Sporen.

Kulturen: 1) Vom Muskel: Aërob: Steril.

2) Vom Muskel und Herzblut: Anaërob: Wachstum (Reinkultur).

Histologischer Befund:

1) Brustmuskel aus dem Bereiche der Injektionsstelle (No. 22, Tafel III). Die Muskelfasern und -bündel auseinandergedrängt. Im interstitiellen Bindegewebe mehr oder weniger reichlich feingekörnt oder homogen aussehende Massen, größere und kleinere Blutungen, verschieden gestaltete, meist leere Hohlräume, Bakterienmassen und Zellenhaufen, die aus ein- und mehrkernigen Rundzellen und roten Blutkörperchen bestehen. Am intensivsten sind alle diese Veränderungen im lockeren Bindegewebe zwischen dem tiefen und oberflächlichen Brustmuskel. Die Muskelfasern selbst zeigen verschieden starke Veränderungen, die schwersten in der Umgebung der größeren Bakterien- und Zellhaufen: Quellung, Auffaserung und Zerfall, zum Teil auch Kernschwund.

Bakterien finden sich in enormen Mengen als Gram-positive, meist kürzere Bacillen, die häufig angeschwollen sind.

2) Hämorrhagische Randpartie des Brustmuskels: Ausgedehnte schwere Veränderungen der Muskelfasern wie oben. Zwischen den Muskelfasern ausge-

breitete, meist streifenförmige Blutungen, feinkörnig aussehende Massen, sowie dichte Züge von Bakterien. Keine entzündliche Infiltration, mäßig viele, länglich gestaltete Hohlräume. Dort, wo größere Blutungen sichtbar sind, zeigen die Muskelfasern in den Hämalaun-Eosinpräparaten eine auffallend starke, dunkelbraune Färbung, in den Methylenblaupräparaten eine stärkere grünliche Färbung. Die roten Blutkörperchen erscheinen oft wie ausgelagert.

Die Bakterienformen sind dieselben wie bei 1).

T 1, am 22. Mai 1902 intramuskulär (rechter großer Brustmuskel) 2 ccm einer 48-stündigen Zuckergelatinekultur von M 16.

Tod der Taube nach 18 Stunden.

Sektion, 7 Stunden post mortem (in der Zwischenzeit am Eis):

Im rechten Brustmuskel Knistern deutlich zu tasten. Der oberflächliche Muskel von dem tiefen stellenweise abgehoben, die Fascie zwischen beiden von einem schmierigen Belage bedeckt. Die Muskulatur selbst stärker durchfeuchtet und nach außen vom Stichkanale im größeren Umkreise mehr oder weniger diffus dunkelschwarzrot gefärbt und von kleineren Gasblasen durchsetzt. Leber braunrot, die übrigen Organe ohne Veränderungen.

Deckglaspräparate (No. 13, Tafel I): Sehr reichlich Bakterien, Gram-positiv, als mittelstarke, kürzere Stäbchen und sehr reichlich in geschwollenen Formen, fast durchweg mit Sporen. Größere gequollene, stärker und auch blaß gefärbte Formen ohne Sporen. Spärlich Gram-negative Formen. — Durch Jod gleichmäßige hellgelbe Färbung, nur selten eine fleckige oder mehr gleichmäßige Braunfärbung.

Kulturen: 1) Aërob vom Muskel: Steril.

2) Anaërob vom Muskel und Herzblut: Reichliches Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

In den Deckglaspräparaten der anaëroben Kulturen vom Muskel lassen sich Sporen nicht nachweisen.

Tierversuche mit Kulturfiltraten.

Für die Versuche wurden 1-proz. Zuckerbouillonkulturen verwendet, die verschieden lange Zeit bei 37° C gehalten und hernach durch Pufffilter filtriert wurden. Alle Filtrate wurden vor der Verwendung auf Keimfreiheit geprüft.

Als Versuchstiere wurden weiße Mäuse und Meerschweinchen benutzt. Die Injektion der Filtrate erfolgte subkutan und intraperitoneal. Die Menge des injizierten Filtrates betrug für Mäuse bis zu 3 ccm, für Meerschweinchen bis zu 5 ccm.

Die beiden Versuchsserien, welche wir mit solchen Filtraten ausführten, hatten nicht dasselbe Resultat. In der ersten Versuchsreihe benutzten wir Filtrate aus 3, 6, 11 und 149 Tage alten Kulturen (sämtliche 4 Kulturen von derselben Generation des Bacillus geimpft) ohne Resultat. In der zweiten Versuchsreihe verwendeten wir 5 und 8 Tage alte Kulturfiltrate, die beide positive Resultate ergaben.

Die damit intraperitoneal geimpften Meerschweinchen (2 und 5 ccm) gingen ein, das eine schon 5½ Stunden nach der Einverleibung des Filtrates. Der Sektionsbefund war ein gleichlautender: serös-hämorrhagische Peritonitis, Transsudat in den Pleurahöhlen und trübe Schwellung der parenchymatösen Organe, vor allem der Leber. Die Anwesenheit von Fibrinflocken und Leukocyten neben reichlichen Endothelien in der trüben, rötlich gefärbten Peritonealflüssigkeit spricht für die entzündliche Natur der peritonealen Veränderungen.

Das subkutan geimpfte Meerschweinchen zeigte nur vorübergehende Krankheitserscheinungen, von denen es sich rasch wieder erholte.

Von den intraperitoneal geimpften weißen Mäusen blieben die am Leben, die weniger als 1 ccm des Filtrates erhalten hatten, die anderen verendeten, davon eine schon 3½ Stunden nach der Einverleibung des Giftes. Auch bei den Mäusen fanden sich Veränderungen in der Bauch-

höhle, die als entzündliche gedeutet werden müssen, Transsudat in den Pleurahöhlen und trübe Schwellung vor allem der Leber.

Die subkutan geimpfte Maus blieb am Leben.

Jedenfalls zeigte die zweite Versuchsreihe, daß unser Bacillus imstande sei, in Zuckerbouillon Giftstoffe zu produzieren, welche in größeren Mengen bei Mäusen und Meerschweinchen oft in recht intensiver Weise zur Geltung kommen.

Die in allen unseren positiven Versuchen mit den Filtraten ausgeführte bakteriologische Kontrolluntersuchung (Deckglaspräparat, anaërobe und aërobe Kultur) ergab in allen Fällen die Reinheit der Versuche.

I. Versuchsserie.

- 1) Filtrat aus einer 3 Tage alten Kultur:
 - a) 6 weiße Mäuse, subkutan und intraperitoneal 0,5—2 ccm.
Ohne Reaktion.
 - b) 4 Meerschweinchen (190—450 g Körpergewicht), subkutan und intraperitoneal 2—5 ccm.
Ohne Reaktion.
- 2) Filtrat aus einer 6 Tage alten Kultur:
 - 6 weiße Mäuse, subkutan und intraperitoneal 0,5—2 ccm.
Ohne Reaktion.
- 3) Filtrat aus einer 11 Tage alten Kultur:
 - 4 weiße Mäuse, subkutan und intraperitoneal 1—2 ccm.
Ohne Reaktion.
- 4) Filtrat aus einer 149 Tage alten Kultur:
 - a) 1 Meerschweinchen von 140 g Körpergewicht, 5 ccm intraperitoneal.
 - b) 3 weiße Mäuse, intraperitoneal 0,5—3 ccm.
Ohne Reaktion.

II. Versuchsserie.

- 1) Filtrat aus einer 5 Tage alten Kultur:
 - a) 2 weiße Mäuse (No. 1 und 2), intraperitoneal 1 und 3 ccm.
 - b) 1 Meerschweinchen von 130 g Körpergewicht, 5 ccm intraperitoneal.

Schon nach 1 $\frac{1}{4}$ Stunden zeigte das Meerschweinchen schwere Krankheitserscheinungen: beschleunigte Atmung, Mattigkeit, Zuckungen in den vorderen Extremitäten, Schmerz bei Berührung und Kollaps.

Auch die Mäuse waren nach dieser Zeit bereits krank. Die Schwere der Erscheinungen war dabei völlig proportional der einverleibten Giftmenge: Maus No. 1 zeigte geringe, Maus No. 2 schwerere Symptome. Letztere atmete auffallend langsam, lag platt am Bauche und fühlte sich ganz kalt an.

3 $\frac{1}{2}$ Stunden nach der Einverleibung des Filtrates verendete Maus No. 2, 5 $\frac{1}{2}$ Stunden danach das Meerschweinchen und zwischen 10—12 Stunden hernach Maus No. 1.

Der Sektionsbefund der gefallen Tiere, die gleich nach ihrem Tode auf Eis gelegt wurden, war folgender:

Meerschweinchen: Das Unterhautbindegewebe des Abdomens etwas feuchter. In der Bauchhöhle ziemlich reichlich leicht gerötete, etwas trübe Flüssigkeit. Peritoneum parietale hellrot, feucht, von vereinzelt kleinsten, hellroten Blutungen durchsetzt; solche Blutungen auch im großen Netze. Serosa des Darmes rosafarben. Milz klein, blaß braunrot. Leber wie gekocht. Nieren braunrot. Nebennieren hellgelb. Lungen blutarm.

Bakteriologischer Befund: Deckglaspräparat von der Flüssigkeit der Bauchhöhle zeigte mäßig viele Endothelien, aber keine Bakterien.

Kulturen: 1) Peritonealflüssigkeit:

a) Anaërob: Steril.

b) Aërob: Steril.

2) Herzblut: Anaërob: Steril.

Maus No. 1: Keine bemerkenswerten Veränderungen bis auf stärkere parenchymatöse Degeneration der Leber.

Bakteriologischer Befund: Abstreifpräparat vom Peritoneum: Ziemlich viele polynukleäre Leukocyten, aber keine Bakterien.

Kulturen: 1) Peritoneum:

a) Anaërob: Steril.

b) Aërob: Steril.

2) Herzblut: Anaërob: Steril.

Maus No. 2: In der Bauchhöhle geringe Mengen nicht ganz klarer Flüssigkeit. Peritoneum parietale und viscerales gerötet und feucht, mit vereinzelt kleinsten Blutungen. Klare Flüssigkeit in beiden Pleurahöhlen.

Bakteriologischer Befund: In Deckglaspräparaten von der Peritonealflüssigkeit keine Bakterien, spärlich Zellen.

Kulturen: 1) Peritonealflüssigkeit:

a) Aërob: Steril.

b) Anaërob: Steril.

2) Herzblut: Anaërob: Steril.

2) Filtrat aus einer 8 Tage alten Kultur:

a) 3 weiße Mäuse (No. 3—5), intraperitoneal 0,25—1 ccm.

b) 1 weiße Maus (No. 6), subkutan 2 ccm.

c) 2 Meerschweinchen, 345 und 115 g schwer, intraperitoneal 5 bzw. 2 ccm.

d) 1 Meerschweinchen von 137 g Körpergewicht, subkutan 5 ccm.

Schon bald nach der Sektion zeigten die Meerschweinchen Krankheitssymptome, die sich in den nächsten Stunden noch steigerten. Die Tiere hatten Kollapserscheinungen. Die beiden intraperitoneal geimpften Tiere verendeten im Laufe des nächsten Tages, das kleinere 19 Stunden, das größere 24 Stunden nach der Einverleibung des Filtrates.

Auch die Mäuse erschienen schon bald nach der Injektion krank, erholten sich aber wieder.

Der Sektionsbefund der beiden Meerschweinchen war ein gleicher: In der Bauchhöhle mäßig viel rötliche, leicht trübe Flüssigkeit. Peritoneum parietale und viscerales stark gerötet, im großen Netze kleinste hellrote Blutungen. Auf der Leberoberfläche und auf dem Omentum zarte Fibrinflocken. Milz klein, blaß braunrot. Leber wie gekocht, morsch. Nebennieren rötlich-gelb. Nieren gelbbraun. In den Pleurahöhlen reichlich klare Flüssigkeit. Lungen blutarm.

Bakteriologischer Befund (größeres Meerschweinchen): Deckglaspräparat von der Peritonealflüssigkeit zeigte keine Bakterien, mäßig viele Zellen.

Kulturen: 1) Peritoneale Flüssigkeit:

a) Aërob: Steril.

b) Anaërob: Steril.

2) Herzblut: Anaërob: Steril.

Der bakteriologische Befund vom kleineren Meerschweinchen entsprach vollständig dem des größeren: alle angelegten Kulturen blieben steril.

Die 3 Mäuse erholten sich wieder vollständig.

Beim subkutan geimpften Meerschweinchen zeigte sich die Haut im Bereiche der Injektionsstelle in ziemlicher Ausdehnung in einen trockenen, schwärzlichen Schorf umgewandelt, welcher sich gegen das umgebende Gewebe scharf abgrenzte.

Entstehung von Schaumorganen.

Ein größeres Kaninchen erhielt am 12. April 1903 5 ccm einer verdünnten Traubenzuckergelatinekultur (48 Stunden alt) intravenös (Randvene des linken Ohres). 15 Sekunden nach der Injektion wurde das Tier durch Nackenschlag getötet und sogleich danach in den Brutofen (37° C) gelegt.

Nachdem das getötete Tier 20 Stunden im Brutofen gelegen hatte, zeigte es folgende Veränderungen:

Der Körper des Tieres ballonartig aufgetrieben. Das subkutane Gewebe des ganzen Körpers, vor allem in den Inguinal- und Achselbeugen, sowie am Thorax und Halse reichlichst von kleinsten Gasbläschen durchsetzt. In den abhängigen Körperpartien neben den Gasblasen im Unterhautbinde- und Fettgewebe noch rötliche Flüssigkeit. An solchen Körperstellen die Muskulatur diffus bläulichrot, aus derselben schaumige Flüssigkeit auspreßbar. Einzelne Muskeln des Halses kirschfarben. Das Abdomen enorm aufgetrieben. Bei Einstich entweicht aus demselben unter zischendem Geräusch Gas, welches mit bläulicher Flamme brennt. Das retroperitoneale Bindegewebe durch größere und kleinere Gasblasen abgehoben. Der Dickdarm prall gefüllt, der Dünn Darm gebläht, in demselben stellenweise schaumiger Inhalt. Der Magen geplatzt. Die Leber klein, zunderartig, reichlichst von kleineren und größeren Gasblasen durchsetzt. Die Milz zum Teile verdaut, die Nieren von zahlreichen kleineren Gasblasen durchsetzt, matsch. Die Lungen ziemlich blutreich, ohne Gasblasen. Im Herzbeutel rötliche Flüssigkeit. Das Herz wie imbibiert, unter dem Epikard zahlreiche kleinste Gasbläschen. Im Herzen schwärzlichrotes, mit Gasblasen untermengtes Blut, zum Teil geronnen. Der Herzmuskel zunderartig, von zahlreichen kleinsten Gasbläschen durchsetzt.

Die dem Tiere entnommene Leber riecht deutlich nach Buttersäure.

Deckglaspräparate: a) Subkutane Flüssigkeit: Mäßig reichliche Gram-

positive Bacillen, ziemlich gleichmäßig dick, etwas schmaler als Anthraxbacillen, fast durchweg mit pol- oder mittelständigen Sporen; b) Leber: Ziemlich reichlich dieselben Gram-positiven, sporentragenden Bacillenformen wie bei a).

Kulturen: a) Leber: 1) aërob: steril; 2) anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) subkutane Flüssigkeit: 1) aërob: steril; 2) anaërob: Wachstum mit Gasbildung wie bei a) (Reinkultur).

Die Deckglaspräparate von den anaëroben Kulturen aus der Leber und der subkutanen Flüssigkeit zeigten dieselben Bacillenformen.

Die von der anaëroben Kultur aus der subkutanen Flüssigkeit angelegte Platte (Zuckeragar unter Wasserstoffatmosphäre) ergab eine Reinkultur von Kolonien, die vollständig mit jenen übereinstimmten, welche in der direkt mit dem Leber-safte des Tieres bestrichenen Zuckeragarplatte (Wasserstoffatmosphäre) gleichfalls in Reinkultur angegangen waren. Und diese Kolonien entsprachen vollständig jenen Kolonienformen, die wir bei dem von uns im vorhergehenden genauer beschriebenen Bacillus zu sehen Gelegenheit hatten.

Die Deckglaspräparate von diesen beiden Platten zeigten gleichfalls identische Bilder: Gram-positive Bacillen, pleomorph, völlig übereinstimmend mit jenen Formen, die wir bei unserem Bacillus sehen konnten.

Die mit Kolonien von den Zuckeragarplatten beschickten Gelatinekulturen ließen nach 48 Stunden das unserem Bacillus entsprechende Wachstum erkennen.

Mit der einen der Gelatinekulturen wurden nach 48 Stunden 2 Meerschweinchen subkutan geimpft. Die Tiere, 200 und 350 g schwer, hatten 2 bzw. 3 ccm der aufgeschüttelten Kultur subkutan injiziert erhalten und verendeten innerhalb 14 Stunden. Die Sektion ergab bei beiden Tieren denselben Befund: Haut am Abdomen bläulichrot. Diese Veränderung scharf gegen die Flanken zu abgegrenzt. Unterhautbinde- und Fettgewebe reichlich von kirschfarbener Flüssigkeit durchtränkt, die zahlreiche kleinere Gasbläschen enthält. Am reichlichsten diese Flüssigkeit in den Achsel- und Inguinalbeugen. Muskulatur feucht und fast kirschfarben. Peritoneum ebenfalls kirschfarben und feucht. Nieren blaßbraungelb, Nebennieren gelblich. Leber wie gekocht, morsch. Milz klein, blaß. Lungen ziemlich blutarm. Herz prall gefüllt.

Deckglaspräparate: a) subkutane Flüssigkeit: Ziemlich reichlich vorwiegend Gram-positive kürzere und längere Bacillen.

In Jodpräparaten meist hellgelbe Stäbchen, spärlicher angeschwollene, dunkelbraune Formen.

b) Peritoneum: Sehr reichlich Gram-positive längere Bacillen und lange Fäden, spärlicher Übergangsformen und Gram-negative.

Kulturen: a) subkutane Flüssigkeit: 1) Aërob: steril; 2) Anaërob: Wachstum mit Gasbildung (Reinkultur).

b) Herzblut: 1) Aërob: steril; 2) Anaërob: steril.

Die angegangenen Zuckeragarkulturen entsprachen vollständig denen unseres Bacillus, desgleichen die von der 2. Zuckergelatinekultur angefertigte Zuckeragarstich- und Milchkultur (Erlenmeyer-Kolben). Die im Brutofen verflüssigte Zuckergelatinekultur war in der Kälte nicht erstarrt.

Wir glauben somit berechtigt zu sein, den aus der Leber und dem subkutanen Gewebe des Kaninchens in Reinkultur gezüchteten anaëroben Bacillus mit dem von uns demselben Tiere vor dessen Tötung intravenös injizierten identifizieren zu dürfen. Damit haben wir den Beweis erbracht, daß das aus unserem Gasbrandfalle gewonnene bewegliche Anaërobion imstande sei, im Tierkörper (Kaninchen) sogenannte Schaumorgane zu erzeugen.

Wie aus dem Vorstehenden ersichtlich ist, war uns Gelegenheit gegeben, den von uns beobachteten Fall von Infektion mit einem anaëroben Bakterium eingehendst zu untersuchen. Wir bemühten uns, diese Untersuchung so gründlich als möglich auszuführen, weil wir der Ansicht sind, daß unsere Kenntnisse über die Infektionen mit Anaërobien nur durch genaueste Beobachtungen gefördert werden können. Gerade für diese Infektionen hat sich, wie aus den zahlreichen, in letzter Zeit veröffentlichten Mitteilungen geschlossen werden darf, allseitig ein regeres Interesse kundgegeben und es ist außer Zweifel, daß es auf diesem Gebiete wissenschaftlicher Forschung noch einige viel umstrittene Fragen gibt.

Das Interesse an diesen Infektionen betrifft aber nicht bloß die Bakteriologie, sondern vor allem auch die pathologische Anatomie und Histologie derselben, nachdem uns durch die Untersuchungen einer Reihe von Autoren bekannt geworden ist, wie sehr die dabei nachweisbaren Gewebsveränderungen in vielen Punkten von denen bei den bekannten anderen Infektionen Abweichungen zeigen.

Das richtige Verständnis für die grob-anatomischen und für die feineren histologischen Organveränderungen dieser Infektionskrankheiten setzt aber notwendig eine gründliche Kenntnis vieler biologischer Eigenschaften ihrer Erreger voraus.

In unserem Falle haben wir nun gerade auch bezüglich der pathologischen Anatomie dieser Infektionen einige bemerkenswerte Tatsachen kennen gelernt, die uns Veranlassung geben, zu einigen der schwebenden Fragen Stellung zu nehmen.

Wie schon aus der Erörterung des pathologisch-anatomischen Befundes ersichtlich ist, handelt es sich in unserem Falle um Veränderungen, die in anatomischer Hinsicht mit jenen vollständig übereinstimmen, welche man bei der als *Grangrène foudroyante*, *Gasgangrän*, *Gasbrand* etc. bezeichneten Infektionserkrankung vorfindet. Wir begnügen uns hier, auf diese Tatsache hinzuweisen, ohne in eine nähere Auseinandersetzung und Begründung dieser Auffassung für unseren Fall einzugehen. Nur soviel sei hervorgehoben, daß im Gegensatze zu diesen zweifelsohne vital entstandenen Veränderungen bei der Sektion auch noch solche gefunden wurden, die sicher postmortal entstanden waren, sich aber nicht ohne weiteres von den ersteren unterscheiden ließen. Es ist außer Frage, daß diese erst post mortem zur Entwicklung gelangten Veränderungen, auf die wir ja auch schon hingewiesen haben, mit den vital entstandenen nicht gut in eine Linie gestellt werden können und daß deshalb für diese eine andere Bezeichnung notwendig erscheine.

Auch die histologischen Veränderungen unseres Falles wollen wir an dieser Stelle nicht eingehender besprechen, sondern einstweilen nur hervorheben, daß im Gegensatze zu anderen Fällen von „Gasbrand“ sich in unserem Falle neben Gasbildung, Nekrose, Muskelzerfall und ödematöser Durchtränkung noch entzündliche Veränderungen — allerdings in geringem Ausmaße — erkennen ließen. Inwieweit diese abhängig sind von der Eigenart des in unserem Falle gefundenen Erregers, wird eingehend erörtert werden müssen.

Daß der in unserem Falle in Reinkultur nachgewiesene Erreger mit jenen Bacillenformen nichts zu tun hat, welche in den letzten Jahren als die häufigste Ursache der als „Gasbrand“ bezeichneten Infektion beschrieben wurden, ist zweifellos: denn diese einheitliche, gut charakterisierte, anaërobe Bakterienart, welche verschiedene Namen führt stellt ein unbewegliches, plumpes Stäbchen dar, welches für gewöhnlich nicht versport, bildet auf anaëroben Platten typische Oberflächenkolonien (Tafel I, No. 10), bringt Milch in charakteristischer Weise unter stürmischer Gasbildung zur Gerinnung, ist für Kaninchen nicht pathogen, während es bei Meerschweinchen gewöhnlich einen rasch zum Tode führenden Krankheitsprozeß erzeugt, welcher dem beim Menschen beobachteten gleicht. Demgegenüber ist der in unserem Falle beobachtete Bacillus ein bewegliches Stäbchen, welches schon unter gewöhnlichen Bedingungen Sporen bildet und sich durch seine oben beschriebenen Wachstumseigentümlichkeiten in der Milch und in den Oberflächenkolonien auf der Agarplatte,

durch seine Pathogenität für Kaninchen und durch seine pathogene Wirkung für den Meerschweinchenorganismus sofort und mit voller Sicherheit von der ersterwähnten unbeweglichen Art unterscheiden läßt.

Um so mehr Schwierigkeiten bereitet aber die Lösung der Frage, ob unser Bacillus mit einer der anderen anaeroben Bakterienarten, welche bei ähnlichen Prozessen gefunden wurden, identisch sei oder nicht. Auch die genaue Untersuchung der morphologischen, kulturellen und tierpathogenen Eigenschaften unseres Bacillus vermindert diese Schwierigkeiten nicht. Der Grund dafür ist in erster Linie wohl darin gelegen, daß die Beschreibungen derjenigen Bakterienarten, die dabei in Betracht kommen, meist aus einer Zeit stammen, in der sich die ersten Anfänge der bakteriologischen Technik ausbildeten, daher unvollständige sind. Aber auch die aus späterer Zeit stammenden Angaben sind vielfach nicht von der wünschenswerten Genauigkeit und Vollständigkeit.

Obwohl wir aus diesem Grunde den in unserem Falle gefundenen Bacillus nicht ohne weiteres mit einer der schon beschriebenen Arten identifizieren können, halten wir es nicht für wahrscheinlich, daß wir es mit einer völlig neuen Art zu tun haben. In vielen Punkten stimmt unser Bacillus mit jenem Bacillentypus überein, welcher in der Literatur als Bacillus des malignen Oedems bekannt ist. Die sich jedoch vielfach widersprechenden Angaben über diesen Bacillentypus, der Mangel einer einwandfreien Charakterisierung derselben und der Umstand, daß zweifellos verschiedene Bakterienarten von den Autoren mit diesem Namen bezeichnet wurden, lassen es als notwendig erscheinen, näher auf die vorhandenen Literaturangaben einzugehen. Das soll in dem zweiten Teile dieser Mitteilung geschehen; in demselben wollen wir auch auf die oben flüchtig berührten pathologisch-anatomischen und histologischen Besonderheiten unseres Falles zurückkommen.

Anmerkung. Der von uns isolierte Bacillus wurde dem bakteriologischen Laboratorium des Herrn Doc. F. Král in Prag, I. Kleiner Ring, übergeben.

Erklärung der Abbildungen.

Tafel I.

- No. 1. Flache Kolonie mit leicht gebuchtetem Rande. Traubenzuckeragarplatte, 4 Tage alt.
- No. 2. Runde Kolonie, leicht erhaben mit steil abfallendem Rande. Agarplatte, 3 Tage alt.
- No. 3. Kolonie mit opakerem, scharf abgesetztem, zentralem und flachem, zart gebuchtetem, peripherem Teile (dieselbe Platte wie No. 1).
- No. 4. Rosettenähnliche Kolonie. Traubenzuckeragarplatte, 4 Tage alt.
- No. 5. „Zerschlissene“ Kolonieform, gleichmäßig flach. Traubenzuckeragarplatte, 4 Tage alt (in derselben Botkin-Glocke mit No. 1, 2 und 4 gezüchtet).
- No. 6. „Zerschlissene“ Kolonie mit opakem erhobenerem Zentrum (von derselben Platte wie No. 5).
- No. 7. Blattförmige Form mit korallenriffartigen und büschelförmigen Fortsätzen. Agarplatte mit feuchter Oberfläche, 6 Tage alt.
- No. 8. Große, blattförmige Wachstumsform von derselben Agarplatte wie No. 7, mit korallenriffartigen Ausläufern, zum Teil in einen diffusen Ueberzug der Platte übergehend.
- No. 9. Strichkultur in einer Traubenzuckeragarplatte mit flachen, teils distinkten, teils konfluierenden gebuchteten Kolonien, 3 Tage alt.
- Die in den No. 1—9 abgebildeten Kolonieformen gehören sämtlich dem Bacillus des im Vorstehenden beschriebenen Gasbrandfalles an.

Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.



Fig. 6.



Fig. 4.



Fig. 5.



Fig. 7.



Fig. 8.

Fig. 10.



Fig. 9.

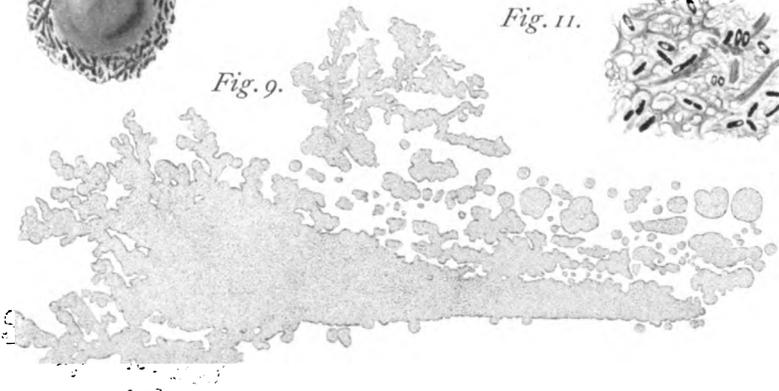


Fig. 11.



Fig. 12.



Fig. 13.



Fig. 14.



Fig. 15.

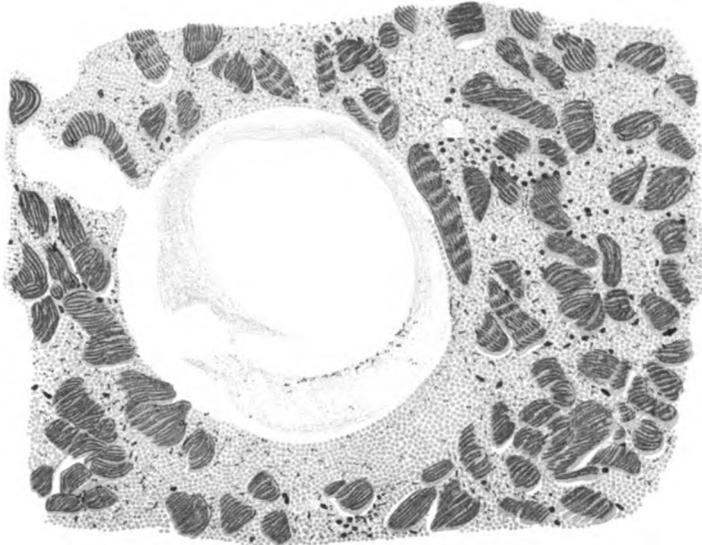


Fig. 16.



Fig. 17.



Fig. 18.



Fig. 19.

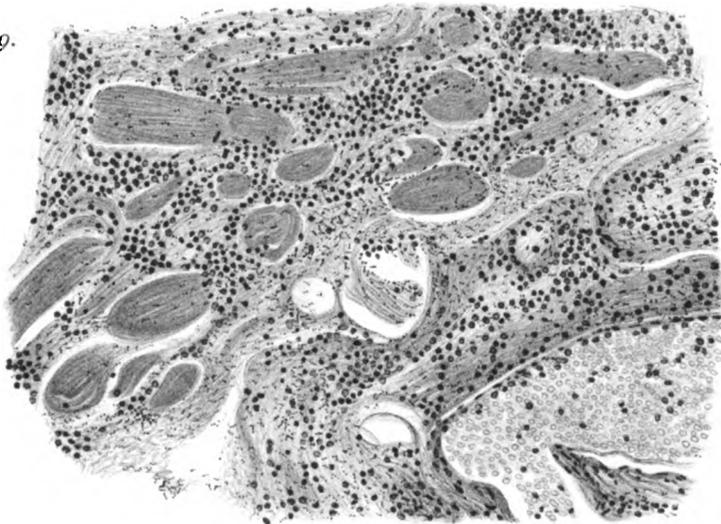


Fig. 20.

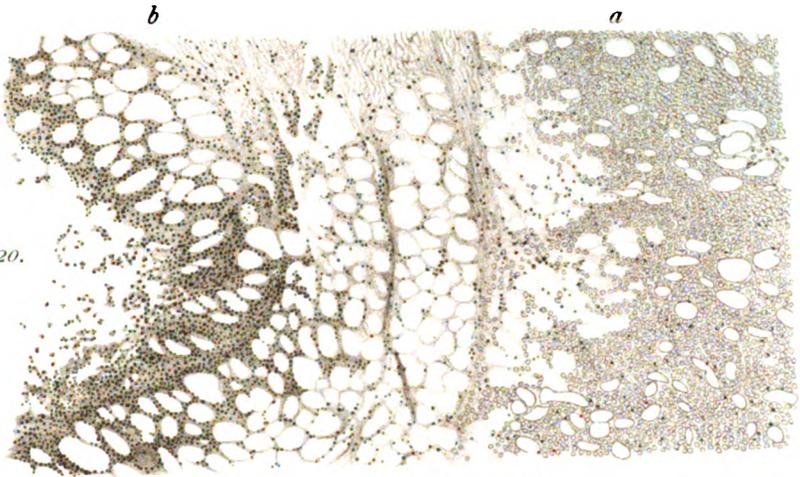


Fig. 21.

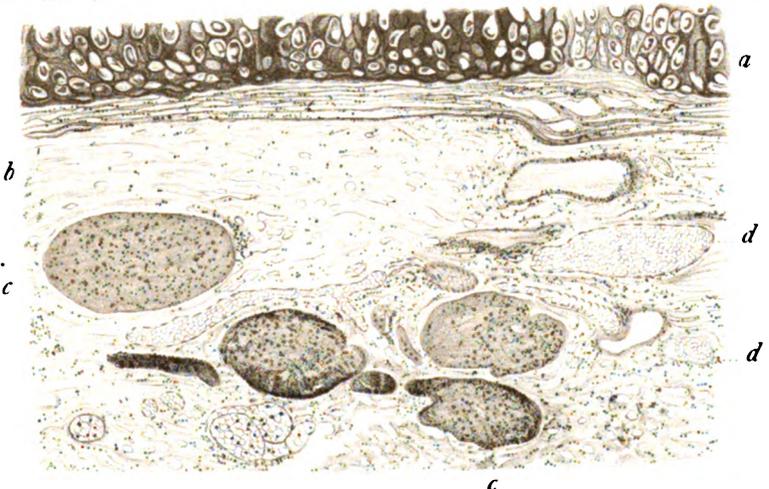


Fig. 22.



No. 10. Kolonie eines Stammes des von Welch, Fraenkel, Hitschmann und Lindenthal u. a. beschriebenen Gasbranderreger. Traubenzuckeragarplatte. 6 Tage alt.

No. 11. Ausstrichpräparat des Muskels vom Menschen, älter erkrankte Partie.

Färbung d. O. (= des Originalpräparates) nach Gram mit Nachfärbung (Fuchsin).

No. 12. Ausstrichpräparat des Muskels vom Menschen, jünger erkrankte Partie.

Färbung d. O. wie No. 11.

No. 13. Ausstrichpräparat aus Taube No. 1 (Muskel).

Färbung d. O. wie No. 11.

No. 14. Deckglaspräparat von der Kolonie einer anaëroben Plattenstrichkultur (4 Tage alt).

Färbung d. O. wie No. 11.

Sämtliche Koloniformen (No. 1—10) wurden nach der in unserer 1. Mitteilung (siehe Centralbl. f. Bakt. etc. I. O. XXXII. Bd. 1902) veröffentlichten Methode unter Wasserstoffatmosphäre bei 37° C gezüchtet.

Tafel II.

No. 15. Schnitt durch einen hämorrhagisch infiltrierten Muskel des rechten Oberschenkels vom Menschen mit einer Gasblase und mit Bacillen an der Peripherie des letzteren und in der Blutung.

Vergrößerung 150-fach (die Bacillen etwas vergrößert eingezeichnet).

Färbung d. O.: Gram-Weigert.

No. 16. Deckglaspräparat von der Kolonie einer anaëroben Plattenstrichkultur, 4 Tage bei 37° C (eine der ersten aus dem Menschen gezüchteten Generationen).

Färbung d. O. nach Gram mit Nachfärbung.

No. 17. Klatschpräparat der Kolonie einer anaëroben Plattenstrichkultur, 4 Tage bei 37° C. Randpartie (ältere Generation).

Färbung d. O. wie bei No. 16.

No. 18. Klatschpräparat derselben Kolonie wie von No. 17. Zentrale Partie.

No. 19. Schnitt durch einen Muskel des Menschen mit kleinzelliger Infiltration, hochgradigem Zerfall der Muskelfasern und mit reichlichen Bacillen.

Vergrößerung 175-fach (Bacillen etwas vergrößert eingezeichnet).

Färbung d. O.: Gram-Weigert.

Tafel III.

No. 20. Schnitt durch das subkutane Binde- und Fettgewebe um die linke inguinale Lymphdrüse eines Meerschweinchens (No. XII, subkutan an der linken Bauchseite geimpft, Tod nach 36 Stunden) mit hämorrhagischer (a) und entzündlicher (b) Infiltration.

Vergrößerung 120-fach.

Färbung d. O. mit Hämalaun-Eosin.

No. 21. Schnitt durch die Außenseite des linken Ohres eines Kaninchens (No. III, intravenös geimpft, Tod nach 63 Stunden).

a) Knorpel;

b) ödematös durchtränktes Bindegewebe mit zahlreichen Bacillen;

c) erweiterte Lungengefäße mit zahlreichen Bacillen, körnigen Massen und abgestoßenen Endothelien;

d) Blutgefäße.

Vergrößerung 145-fach (die Bacillen etwas vergrößert eingezeichnet).

Färbung d. O.: Gram-Weigert.

No. 22. Schnitt durch den tiefen Brustmuskel einer Taube (No. II, intramuskulär geimpft, Tod nach 20 Stunden).

a) Muskelfasern;

b) entzündliche Infiltration mit Bacillenmassen im Bindegewebe zwischen tiefem und oberflächlichem Brustmuskel.

Vergrößerung 200-fach.

Färbung d. O.: Gram-Weigert.

Nachdruck verboten.

Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus.

[From the Jenner Institute of Preventive Medicine, London.]

By Dr. Allan Macfadyen and Sydney Rowland.

With 2 Figures.

The following paper contains an account of the results that have been obtained as regards the typhoid bacillus since the publication of our first communication in the *Centralblatt für Bakteriologie*. Abt. I. Vol. XXX. 1901. No. 20.

The investigations undertaken had, as was then stated, a special object in view, viz: the study of certain of the intracellular factors in health and disease by obtaining directly the cell constituents and eliminating as far as possible excreted substances and those formed by the cell in a given environment. The ordinary laboratory methods could not be employed for this purpose, and it was necessary in the first instance to devise the means of carrying out the research. The progress of the inquiry has therefore necessarily been slow, as many technical difficulties had to be overcome. The investigation has now been successfully advanced in various directions. The intracellular juices of healthy and morbid tissues, of leucocytes and of a number of micro-organisms have been obtained and submitted to examination by the writers and their colleagues. The results, in so far as published, are referred to at the end of the paper. The experiments carried out with the typhoid organism and the results obtained were of the following nature.

I. Experiments with reference to an extracellular typhoid toxin.

The existence of a specific toxin produced by the typhoid bacillus has hitherto not been demonstrated although it has been assumed by analogy with other organisms, and by reasoning from the clinical course of the disease. Such a poison must be either extracellular or intracellular. The endeavours however, to demonstrate the production of an extracellular toxin by the typhoid bacillus have not hitherto led to any definite results. That a toxin of this character does not exist in filtered cultures of the organism is the common experience of bacteriologists. The typhoid organism when grown in the ordinary culture media does not produce any soluble products with marked poisonous properties. The absence from such cultures of definite toxins might be due to the unsuitability of the soil used for growing the typhoid bacillus.

We considered it of importance to retest the question, since the detection of such a toxin would constitute a great advance in the understanding and the treatment of the disease.

The first step in the search for the body in question consisted in substituting for the usual broth and peptone media, culture fluids approaching more nearly in constitution the natural body soils which clinically support the life of the bacillus. A number of experiments extending over a year were made in this direction. We endeavoured to cultivate the typhoid bacillus in fresh juices obtained from various organs of the

animal body, and representing the intracellular juices of the tissues. The spleen, lymphatic glands and intestinal mucous membrane were triturated and the juices expressed at a low temperature in order to prevent changes in the material during the grinding process. Such media would approximate more closely in constitution to the substances the typhoid organism might be expected to meet in the course of its stay in the body of a host in which it is producing toxic symptoms, and particularly if heat were avoided in their preparation. The fresh organs or tissues from the ox or the calf, as received from the slaughterhouse, were finely minced in a mincing machine and the resulting pulp disintegrated according to the methods employed by us in the preparation of Zymase, viz: with the aid of sand, the mass being kept cool during the process by an outer jacket of brine or carbonic acid (1).

The fresh juices thus obtained were passed through a Berkefeld filter to ensure sterility, and in each instance the intracellular juice was brought to the requisite degree of alkalinity by the addition of sodic carbonate. These juices were employed as a culture soil for the typhoid bacillus under the following conditions:

- 1) The organ juice per se.
- 2) The organ juice with an admixture of fresh human serum.
- 3) The organ juice after heating to 55° C for twenty minutes, and with or without the subsequent addition of fresh human serum.

The above conditions were applied to organ juices obtained from the fresh spleen of the ox, the lymphatic glands (mesenteric) of the calf and the intestinal epithelium of the ox and a few other animals. The media were inoculated with the typhoid bacillus alone and in a series of experiments, with the typhoid bacillus in conjunction with the bacillus coli communis. In every instance a parallel series of cultures was made under aerobic and anaerobic conditions. We were able to cultivate the typhoid bacillus under the above conditions and to determine in how far its toxicity was thereby affected. After an incubation at blood heat for four weeks the cultures were examined as to the presence of growth and freedom from contamination. The cultures were then passed through a Berkefeld filter to remove the organisms, and the filtrates injected into animals in small and large doses (e. g. 5 cub. c. and more). The experimental animals were guinea pigs, rabbits and monkeys. With the possible exception of one spleen juice, none of the fluids thus obtained exhibited any acute toxic power, either when used as culture soils for the typhoid organism or in conjunction with the colon bacillus. In the case of the rabbit and the monkey the fluids were practically innocuous. As regards the guinea pig no immediate toxic effect was observed. In a certain number of cases, however, the guinea pigs eventually died at the end of a period which averaged about six weeks. If one excludes the possibility of substances toxic to the guinea pig being naturally present in the organ juices (of which we possess a certain amount of experimental evidence), the result might be interpreted as being due to some slowly acting soluble toxin or toxins derived from the typhoid bacillus. We have not however as yet been able to observe any distinct effects on post mortem examination, and are at present unable to ascribe any definite significance to the result. It will be sufficient in the meanwhile to record the fact, and to omit the table of results as they are not essential to the present paper. Such toxins, if they exist, are quite different in properties to the intracellular toxin we are about to describe. The experiments were suf-

ficient to lead us to the conclusion that in no case was an extracellular toxin developed comparable in any way to those obtained from pure cultures of undoubtedly extracellular toxin-producing organisms, e. g. the diphtheria bacillus, etc. It did not appear that this line of investigation would be likely to lead to any practical results. The very large number of experiments made with the most natural soils obtainable had not been successful in demonstrating the presence in cultures of the typhoid bacillus of any definite toxin of likely value for immunising purposes.

II. Experiments with reference to an intracellular typhoid toxin.

The experiments having failed to establish the presence of any definite extracellular toxin, it became necessary to search within the typhoid organism itself for the missing toxin. The research was thus directed not to the products of the typhoid bacillus, but to the organism itself and its intracellular constituents. For this purpose the endeavour was made to obtain the fresh unmodified cell plasma of the organism and the method originally employed was as follows: The virulent typhoid bacilli were grown on the surface of nutrient agar in flat rectangular bottles, each giving a surface of 200 sq. cm; one hundred such culture bottles were required in order to yield a growth sufficient for trituration by the method that was in the first instance adopted. After cultivation for about 36 hours at blood heat, the bottles on being washed out with salt solution, yielded about one litre of a thick emulsion of the bacilli. The bacilli were separated from the emulsion by means of a high speed centrifuge, and were at the same time thoroughly washed free of possible excretory products by repeated additions of physiological salt solution. The washed and separated bacilli were then mixed with fine silver sand and trituated in a cold-jacketed metal cylinder by means of small vanes revolving at a high velocity. The intercollision of sand particles and bacilli resulted in the rupture of the bacterial cells, and the process usually occupied from three to four hours. The resultant mass was filtered through Kieselguhr with the aid of a hydraulic press. The filtrate represented a rich watery solution or suspension of the intracellular constituents of the typhoid bacillus in so far as these were capable of passage through the Kieselguhr. There remained at the end of the pressing a hard cake of Kieselguhr, which was found to contain a considerable amount of retained albuminous and other organic substances. Repeated extractions of this cake, made with glycerine and with a solution of carbonate of soda, demonstrated that the Kieselguhr cake contained physiologically active constituents of the typhoid organism. There had undoubtedly been held back intracellular elements of possible importance to the experiments we desired to carry out. The entire operation lasted about six hours and the average yield of juice from the first pressing was about 8 ccm. An account has already been given of the experiments made with such juices upon guinea pigs and rabbits with a view to testing their toxicity and immunising properties against the bacillus typhosus. It was found that the fluid, injected in doses of 1, 0.5 and 0.2 ccm completely protected the experimental animals against one to ten lethal doses of virulent typhoid bacilli, and the protection following one such injection lasted about four weeks. The results were identical whether a first, second or third pressing of the juice through the Kieselguhr was employed. The juices preserved their immunising properties as regards the typhoid bacillus for a considerable period of time,

as at the end of four months they were still found to be active in this respect. The cell plasma on subcutaneous inoculation was very quickly absorbed without evidence of local irritation. The quick absorption of the cell juices by the tissues and the absence of local irritation we regard as a point of considerable practical importance. If the full immunising effect as regards the typhoid bacillus per se is to be attained by the injection of the plasma obtained from its cell substance, such a method of procedure would undoubtedly present considerable advantages over the other methods that have hitherto been employed with the same end in view, e. g. the use of heated cultures and the intact bodies of the bacilli as vaccines etc. The ideal method of procedure would be to obtain an immunising substance directly from the bacterial cells, of nonirritating properties, capable of rapid and complete absorption by the tissues, and freed from all the superfluous material present in the ordinary culture media.

In this respect the methods we were employing appeared to furnish the hope of obtaining an active and at the same time a purer material than had hitherto been found possible. The appearance of the agglutination reaction in the blood of the treated animals afforded evidence that we were dealing with intracellular juices which possessed active physiological properties. This reaction appeared very quickly and persisted for a considerable period of time, and was still present when the specific protective substances had disappeared from or ceased to be active in the blood. In the case of the rabbit an agglutination of the typhoid bacillus occurred nine months subsequent to the injection of the typhoid cell juice subcutaneously. On intravenous injection we have succeeded in obtaining the agglutination reaction within seventeen hours, and at times in two hours, after inoculation with a dilution of 1 in 100 of rabbits blood. One injection of the cell juice was sufficient to develop antibacterial properties in the blood of the treated animals. At the end of a month the serum was actively bacteriolytic. A complete destruction of the typhoid bacilli by the serum in doses of $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{20}$ and $\frac{1}{50}$ ccm, occurred within two hours. The agglutinative and bacteriolytic action was obtained with the blood serum of treated rabbits and monkeys.

The experiments at this stage had demonstrated that the typhoid cell plasma, obtained by the above methods, possessed active physiological properties, and that on injection they afforded a certain protection against virulent typhoid organisms in virtue of specific bacteriolytic properties developed in the blood of the treated animals. At the same time the yield of active cell plasma by the above mentioned triturating process did not prove to be of a quantitative character. A considerable amount of the cell constituents was retained in the Kieselguhr sponge. The method appeared in this respect to be capable of improvement and particularly with reference to the minute cells that we were dealing with. A method which would eliminate the sand and Kieselguhr, as employed by other observers (Buchner, Hahn etc.) and by ourselves, and would at the same time produce a rapid trituration of the organisms was, we found by experience, essential. The method, if it could be successfully devised, would yield the entire intracellular constituents of the micro-organisms in question for the purpose of experiment. We had likewise noted the tolerance exhibited by the treated animals, and particularly by the guinea pig, to the injection of large quantities of the expressed cell plasma of the typhoid bacillus. Whilst the immunising properties of the cell juices, as

regards the typhoid organism, had been demonstrated, acute and definite toxic effects had proved remarkable by their absence.

These various observations led us to endeavour to improve the methods employed, and to relinquish the procedure on lines analogous to those of Buchner, Hahn and other investigators in the study of expressed cell juices. The results, on the injection of such expressed cell juices into animals, were purely of an antibacterial character, an active toxin in the cell plasma and consequently antitoxic properties in the blood of the treated animals had not been demonstrated. This constituted a serious gap in the experiments, if we assume that an intoxication of the system in the case of enteric fever is a grave and perhaps the cardinal factor to be considered in the treatment of the disease.

The filtering action of the Kieselguhr used in the filter pressing appeared to be the most likely reason for lack of success in this direction. The disintegration of the organisms was therefore attempted without the admixture of any foreign material which would render a subsequent filtration through Kieselguhr necessary.

III. Experiments with cold grinding methods.

The mechanical method of disintegration that appeared to be most likely to lead to successful results in the case of bacteria was their trituration whilst in a frozen and brittle condition. It had already been demonstrated (2) that an exposure to the temperature of liquid air (about -190°C) did not injure or destroy the vitality of bacteria, and that micro-organisms might be kept for as long a period as six months at this low temperature without any deleterious effect.

This important point being determined, it appeared probable that the brittleness of the cells at this low temperature would favour their mechanical disintegration without any admixture of sand or other foreign substance. The most convenient agent for the production of the necessary cold was liquid air. Liquid air possessed two practical advantages: — it could be more conveniently handled than other substances that might possibly have given the necessary conditions of cold at higher temperatures than -190°C and it furnished a fluid freezing bath in which the material to be ground could be directly immersed. These properties have proved of great practical value in the course of the experiments. A further advantage was that at such a temperature the ordinary chemical processes would cease, changes due to heat would be eliminated, and the process if successful would furnish a quantitative yield of unaltered cell plasma.

The experiments were successful and the feasibility of disintegrating micro-organisms *per se*, without any admixture of triturating substances was demonstrated. The complete disintegration of the typhoid bacillus was accomplished at the temperature of liquid air in a period of about two hours without the addition of sand or other foreign substance.

The method has likewise been successfully applied to a number of bacteria, to other types of vegetable cells, and to animal organs and tissues, and their intracellular juices obtained for experimental purposes.

The method entirely obviates the use of any accessory grinding or filtering substances and fulfils the conditions we desired to obtain for the study of intracellular constituents.

These conditions were as follows:

- 1) That no chemical or heat changes should take place during the process of disintegration,

2) That the disintegration should be accomplished without the addition of any triturating substance, the necessary subsequent removal of which might vitiate the composition of the resulting mass.

3) That the process should furnish a quantitative yield of the unmodified cell plasma.

In this communication we will confine ourselves to the results obtained with the typhoid bacillus. (Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Biologie des Milzbrandbacillus und sein Nachweis im Kadaver der grossen Haustiere.

Von **J. Bongert**,

städtischem Tierarzt und Leiter des bakteriologischen Laboratoriums auf dem städtischen Schlachthofe zu Berlin.

Mit 3 Tafeln.

(Fortsetzung.)

Den Auflösungsprozeß der Milzbrandbacillen durch Plasmyolyse kann man auch in Milzbrandkulturen, in welchen die Sporenbildung auf irgend eine Weise unterdrückt wird, beobachten. Namentlich tritt die Plasmoptyse deutlich hervor. Man sieht neben intakten Milzbrandbacillen leere Hüllen, welche teilweise noch einen feinkörnigen Inhalt besitzen, und, letzteren vielfach reihenweise angelagert, kleine, sich stark färbende, kokken- oder bacillenähnliche Plasmakörnchen, die Ueberreste des ausgetretenen Zelleibes. In milzbrandigen Organen kann man denselben Auflösungsprozeß sehr gut verfolgen, wenn man, wie bei dem Versuche von Berndt, durch frühzeitige Entnahme des Untersuchungsmaterials aus dem Kadaver und durch möglichst sterile Aufbewahrung die Fäulnisprozesse hinausschiebt. In einem Falle konnte ich die leeren Kapseln der Milzbrandbacillen noch am 12. Tage, in einem anderen Falle bis zum 7. Tage mit Sicherheit mit Hilfe der Klettischen Doppelfärbung und mit Loefflers Methylenblaulösung nachweisen (No. 10 und 14 der Tabelle). Wie rasch aber andererseits die Auflösung der Milzbrandbacillen in faulendem Blute vor sich gehen kann, möge man daraus entnehmen, daß in mehreren Versuchen etwa 1 Stunde nach dem Vermischen von Milzbrandbacillen (frische Milzpulpa) mit faulendem Blute weder durch Ausstrich noch durch Plattenkultur Milzbrandbacillen nachzuweisen waren. Nach meinen Beobachtungen üben namentlich jene plumpen, anaëroben Stäbchen mit endständiger Spore, welche eine gewisse Aehnlichkeit mit Rauschbrandbacillen besitzen und sehr bald nach dem Tode von dem Darne in die Blutbahn eindringen, durch ihre Stoffwechselprodukte eine starke bakteriolytische Wirkung auf die Milzbrandbacillen aus, so daß nach kurzer Zeit auch nicht eine Spur mehr von letzteren zu sehen ist. Dieselbe rasche auflösende Wirkung übt bekanntlich, wie Emmerich und Löw (26), Charrin (27), Emmerich und Saida (28) u. a. nachgewiesen haben, auch der *Bacillus pyocyaneus* durch seine Stoffwechselprodukte auf den Milzbrandbacillus aus. Die Wirkung beruht nach Emmerich (l. c.) auf einem fermentartigen Stoffe, welcher Pyocyanase genannt wird. Daß die Gestaltsveränderungen der Milzbrandbacillen und schließlich ihr Zerfall

durch die Stoffwechselprodukte der Fäulniserreger hervorgerufen werden, wird nicht weiter auffallen können mit Rücksicht auf die äußerst geringe Tenazität der Milzbrandbacillen chemischen und thermischen Reizen gegenüber. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß schon 0,1-proz. Karbolsäurelösung, ja bereits Aqua dest. und gewöhnliches Leitungswasser Plasmolyse hervorruft und die Milzbrandbacillen zur Auflösung bringt.

Unter dem Einflusse der Fäulniserreger verwischen sich also, wie wir gesehen haben, die als charakteristisch angesehenen Merkmale der Milzbrandbacillen, so daß dieselben schließlich von morphologisch ähnlichen Stäbchen mit Sicherheit nicht unterschieden werden können: Der Nachweis der Kapsel mißlingt; wegen des Zerfalles und der Abnahme der Zahl der Milzbrandstäbchen tritt die Gliederung nicht mehr deutlich hervor. Die Stäbchen liegen vereinzelt; sie erscheinen länger und zeigen, weil sie vereinzelt liegen, keine quer abgestutzten, sondern abgerundete Enden. Unter diesen Verhältnissen muß die Milzbranddiagnose, lediglich auf Grund der mikroskopischen Untersuchung von Ausstrichpräparaten gestellt, nach beiden Seiten hin, im positiven und negativen Sinne, unter allen Umständen als unzuverlässig erachtet werden. Die Unzuverlässigkeit der mikroskopischen Untersuchung bei dem oben skizzierten Befunde erkennt auch John e an (l. c. p. 428). Nur ist er der Meinung, daß der Zeitpunkt, wann es nicht mehr gelingt, in Ausstrichpräparaten Milzbrandbacillen, erkennbar an der Kapsel, mit Sicherheit nachzuweisen, viel später einzutreten pflegt, als gewöhnlich die amtlichen Milzbrandfeststellungen stattzufinden pflegen. Das trifft jedoch nicht immer zu. Wann der Zeitpunkt eintritt, zu welchem man nicht mehr im stande ist, unter zahlreichen Fäulnisstäbchen, welche auch gegliedert, zuweilen quer abgestutzt sind und auch eine Kapsel besitzen können (s. Phot. 5 und 19), vereinzelt in Auflösung begriffene und daher nicht mehr charakteristische Milzbrandstäbchen herauszuerkennen, läßt sich allgemeingültig nicht angeben. So leicht in der Regel innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Tode mit Hilfe eines gefärbten Ausstrichpräparates die Milzbranddiagnose zu stellen ist, so schwierig und unsicher kann sich in vielen Fällen diese Art der Diagnose bei eingetretener Fäulnis, in welcher der Regel nach der mit der amtlichen Feststellung betraute Sachverständige den Kadaver antrifft, gestalten. Die Zeit, wie lange nach dem Tode die Milzbranddiagnose auf Grund von Deckglaspräparaten möglich ist, hängt von verschiedenen äußeren Umständen ab, welche die Fäulnisprozesse beeinflussen. In dieser Beziehung kommen in Betracht die Zeit, wie lange ein Milzbrandkadaver uneröffnet bis zur Vornahme der Sektion gelegen hat, die Außentemperatur, die Größe des Kadavers und die Bakterienarten, welche sich ansiedeln oder bereits vom Darne aus nach dem Tode des Tieres in die Blutbahn und die Hinterleibsorgane vorgedrungen sind. Im uneröffneten Kadaver verlaufen die Fäulnisprozesse viel lebhafter und schneller wie im geöffneten, wozu noch besonders die starke bakteriolytische Wirkung gewisser anaërober Fäulnisstäbchen auf die Milzbrandbacillen tritt, wie wir weiter unten sehen werden. Die Größe des Kadavers ist insofern von Einfluß auf die mehr oder weniger längere Möglichkeit des Nachweises der Milzbrandbacillen, als ein großer Kadaver bedeutend langsamer erkaltet und infolgedessen rascher der Fäulnis anheimfällt, wie ein kleiner Kadaver. Endlich kommt noch in Betracht die Aufbewahrungsart des zur mikroskopischen Untersuchung entnommenen Materials.

Im Sommer bei hoher Außentemperatur konnte ich die von Olt (l. c.) gemachte Beobachtung bestätigen, daß bereits 48 Stunden nach dem Tode infolge schnell eingetretener Fäulnis Milzbrandbacillen durch Ausstrichpräparate mit Sicherheit nicht mehr nachzuweisen waren. Ich verweise in dieser Beziehung auf No. 9 und 12 der Versuchstabelle. Andererseits fanden sich in einer Milzbrandmilz, welche im letzten Winter in einem ungeheizten Raume bei -5° bis $+2^{\circ}$ C, offenstehend in einer Glasschale, aufbewahrt wurde, noch am 12. Tage die an den in größerer Zahl noch vorhandenen leeren Kapseln erkennbaren Ueberreste der Milzbrandstäbchen (No. 10 der Tabelle). Erst von diesem Tage an, als mit dem Umschlage der Witterung eine schnellere Fäulnis sich einstellte und die bisher in sehr geringer Zahl vorhandenen Bakterien sich stark vermehrten, war ein sicheres Unterscheiden von den nunmehr in größerer Menge auftretenden milzbrandähnlichen Fäulnisstäbchen nicht mehr möglich, und die letzte Spur von Kapselendungen verschwand sehr bald. Diese äußerst lange Konservierung der Milzbrandbacillen war jedoch auf sehr günstige äußere Verhältnisse zurückzuführen, wie sie in praxi nur selten vorliegen. Als solche sind zu nennen die kurze Zeit nach dem Tode vorgenommene Sektion, wodurch die anaeroben Kadaverbacillen ausgeschaltet wurden, die sofortige Herausnahme der Milz aus dem noch nicht erstarrten Kadaver und die Aufbewahrung eines Stückes derselben in einer Glasschale bei kalter, trockener Witterung. Hierdurch war es ermöglicht, daß das nur wenig verunreinigte Milzstück innerhalb eines Tages oberflächlich eintrocknete, so daß dem Eindringen von Fäulniskeimen von außen her die Möglichkeit genommen war. Bei No. 14 der Versuche konnten Milzbrandbacillen in Ausstrichpräparaten noch am 7. Tage mit Sicherheit nachgewiesen werden. Auch in diesem Falle fand die Sektion und die Entnahme des Untersuchungsmaterials bald nach dem Tode statt. In den anderen Fällen, wo die Kadaver 1—2 Tage nach dem Tode des Tieres bei hoher Außentemperatur gelegen hatten, ehe sie sezirt wurden, war schon am 3. Tage nach dem Tode mit Sicherheit die Milzbranddiagnose durch die mikroskopische Untersuchung allein nicht mehr zu stellen.

Mit diesem Ergebnisse des Nachweises der Milzbrandbacillen in Kadavern von großen Haustieren stehen die von Mehrdorf (16b) an Milzbrandmäusen gemachten Versuche, deren Resultate ich bestätigen konnte, nicht oder nur scheinbar in Widerspruch. In uneröffneten Kadavern von an Milzbrand gestorbenen Mäusen lassen sich in Organausstrichen noch am 6. Tage, in Ausstrichen von Blut aus Unterhautvenen noch nach 8 Tagen in der Regel gut differenzierte Milzbrandbacillen nachweisen. Berücksichtigt man aber, daß die kleinen Mäusekadaver sehr bald erkalten und eintrocknen und infolgedessen Fäulnisprozesse und der durch diese verursachte Zerfall der Milzbrandstäbchen weniger lebhaft von statten gehen können, so wird der Ausfall der letztgenannten Versuche nicht weiter überraschen. Es kann daher das Ergebnis des Nachweises der Milzbrandbacillen in kleinen Tierkadavern auf die ähnlichen Verhältnisse bei den großen Haustieren nicht ohne weiteres oder ohne wesentliche Einschränkungen übertragen werden.

Die verschiedenen Aufbewahrungsmethoden des Milzbrandmaterials hatten auf die Konservierung der Milzbrandbacillen nur eine untergeordnete Bedeutung. Entscheidend war immer das Vorhandensein der sekundären Fäulniskeime.

Zu dieser geschilderten Schwierigkeit des rein morphologischen

Nachweises des Milzbrandbacillus in dem faulenden Tierkörper tritt aber noch ein anderer Umstand, welcher bisher merkwürdigerweise nur wenig Beachtung gefunden hat. Man ist gewohnt, in den Milz- und Blutaustriichen der an Milzbrand gestorbenen Tiere die Milzbrandbacillen in größerer Anzahl vorzufinden. Man glaubt ziemlich allgemein, daß das Auffinden von Milzbrandstäbchen in gefärbten Deckglaspräparaten von frischem Milzbrandmaterial keine großen Schwierigkeiten verursacht. Das trifft aber keineswegs immer zu. Wie Frank und Lubarsch (29) experimentell nachgewiesen haben, tritt erst kurz vor dem Tode, in der Agonie, der Milzbrandbacillus in größerer Anzahl in den größeren Blutgefäßen auf. Demzufolge ist die Möglichkeit vorhanden, daß bei apoplektiform verlaufendem Milzbrande die rapide agonale Vermehrung der Milzbrandbacillen im Kapillarsystem der Organe und in den größeren Blutgefäßen fortfällt und somit nur sehr wenige Stäbchen im Blute und der Milz vorhanden sind, welche bei der Durchmusterung von Deckglaspräparaten übersehen werden können. Dieses äußerst spärliche Vorhandensein von Milzbrandstäbchen habe ich in mehreren Fällen beobachten können. In einem Falle handelte es sich um eine auf dem Berliner Schlachthofe an Milzbrand verendete Kuh (No. 12 der Tabelle). Die Sektion und bakteriologische Untersuchung fand ca. 16 Stunden nach dem Tode statt. Milztumor war wenig ausgeprägt, Darmentzündung nicht vorhanden. Die rechte Lunge stark bluthaltig, fast vollständig schwarzrot gefärbt. Glottisödem und eine geringgradige sulzige Ergießung in der Umgebung des Kehlkopfes ließen allein an Milzbrand denken. In den Milzaustriichen konnte ich erst im 3. Präparate ganz vereinzelte Milzbrandbacillen mit deutlicher Kapsel nachweisen, dagegen fanden sich in ziemlicher Anzahl plumpe Stäbchen mit end- und mittelständigen Sporen (Oedembacillen). Auch in den Ausstriichen von dem Ohrvenenblute fand ich erst nach eingehendem Durchmustern der Präparate wenige Milzbrandstäbchen. In einem anderen Falle war von dem Kreistierarzte L. Material zur Untersuchung auf Milzbrand eingesandt worden. Laut Mitteilung waren plötzlich 3 Kühe gestorben. Die Sektion ergab Darmentzündung mit wenig ausgeprägtem Milztumor, daneben geringgradige septikämische Erscheinungen, die ebenfalls nicht auf Milzbrand schließen ließen. Da L. in den angefertigten Milzaustriichen Milzbrandbacillen nicht nachweisen konnte, nahm er als Todesursache eine mykotische Darmentzündung, bedingt durch Futterschädlichkeiten, an. Ich konnte bei der Nachprüfung den mikroskopischen Befund von L. bestätigen. Auch mir gelang es nicht, in mehreren von dem übersandten Materiale angefertigten Ausstrichpräparaten Milzbrandbacillen oder irgendwelche andere Bakterien nachzuweisen. Dahingegen gelang der Nachweis der Milzbrandbacillen in diesem wie in dem ersten Falle leicht durch Plattenkultur.

Wie Tschernogoreff (30), v. Rátz (31) und Garth (32) nachgewiesen haben, ist dieses spärliche Vorhandensein von Milzbrandbacillen im Blute und in der Milz die Regel beim Milzbrande des Schweines. In den Halslymphdrüsen finden sich die letzteren in reichlicher Menge, wie v. Rátz feststellte. Demgemäß fielen die Impfversuche an Mäusen mit Lymphdrüsensaft positiv, mit Milzpulpa negativ aus. v. Rátz glaubt auch annehmen zu müssen, daß die Schweine infolge der diesen eigentümlichen Milzbrandform, der Anthraxbräune, früher an Erstickung sterben, ehe die Bacillen ins Blut bzw. in die Milz gelangen.

Auch von anderen an Milzbrand gestorbenen Tieren liegen in der

Literatur einige kurze Mitteilungen vor, wonach der mikroskopische Nachweis der Milzbrandbacillen wegen des spärlichen Vorhandenseins derselben im Blute nicht gelang. Moril (33) fand bei 2 plötzlich anscheinend an Milzbrand verendeten Rindern keine Bacillen im Blute. Ein mit diesem Blute geimpftes Kaninchen starb nach 20 Stunden und ließ nunmehr in seinem Blute die charakteristischen Milzbrandbacillen massenhaft erkennen. Fiorentini (34) konnte bei einem an Milzbrand eingegangenen Pferde in der Milz und dem Blute nur sehr spärliche Milzbrandbacillen nachweisen, dahingegen in den Mesenterialdrüsen in größerer Menge. Er schließt hieraus irrtümlich, daß in diesem Falle Sporen bezw. Milzbrandbacillen vom Darne aus durch Sclerostomum-Verletzungen bis in die Mesenterialdrüsen eingedrungen wären und sich dort vermehrt hätten. Wir wissen jedoch aus den Versuchen von R. Koch (l. c. p. 169), daß zum Zustandekommen einer Milzbrandinfektion vom Darne aus solche Verletzungen nicht erforderlich sind, daß die Milzbrandbacillen durch die intakte Darmschleimhaut hindurchwachsen, und daß andererseits die den charakteristischen Milzbrandveränderungen (Milzbrandlokalisationen) benachbarten Lymphdrüsen stets geschwollen, gerötet und mit Milzbrandbacillen gefüllt sind.

Sodann berichtet Siebenrogg (35) von einem in der Agonie geschlachteten Rinde, welches typischen Milzbrand darbot und zu einer Milzbrandinfektion beim Menschen Veranlassung gab. In den Milz- und Blutaussstrichen konnten jedoch Milzbrandbacillen nicht nachgewiesen werden.

Paul (36) beschreibt einen Milzbrandfall beim Rinde mit negativem Bacillenbefunde. In Blut- und Milzaussstrichen konnten durch die mikroskopische Untersuchung Milzbrandbacillen nicht nachgewiesen werden, während der Nachweis durch Anlegen von Kulturen gelang.

Endlich hat R. Koch bereits in seiner klassischen Arbeit über die Aetiologie des Milzbrandes aus dem Jahre 1881 erwähnt, daß er in einigen Fällen von Darmmilzbrand des Rindes „im Blute nur nach langem Suchen einige Stäbchen aufzufinden vermochte“, und daß die Milz nicht vergrößert war.

Außer dieser durch plötzlich Verenden bedingten Bacillenarmut kann sich eine solche auch nachträglich unter der bakteriolytischen Wirkung bestimmter Bakterien, welche nach dem Tode vom Darne aus in die Blutbahn einwandern, in ganz kurzer Zeit ausbilden. Es sind dieses, wie bereits erwähnt, nach meinen Beobachtungen plumpe, anaerobe Stäbchen mit endständigen Sporen. Diese bakteriolytische Auflösung der Milzbrandbacillen im Kadaver konnte experimentell an zwei zu Demonstrationszwecken mit Milzbrand infizierten Schafen nachgewiesen werden. In den kurze Zeit nach dem Tode der Tiere angefertigten Ausstrichpräparaten von Halsvenenblut fanden sich in größerer Zahl typische Milzbrandbacillen mit deutlicher Kapsel. Als nun am nächsten Tage die Kadaver sezirt wurden, nachdem sie ca. 24 Stunden in einem geheizten Raume bei 18° C uneröffnet gelegen hatten, fanden sich in den in größerer Anzahl aus der Milz und dem Halsvenenblut angefertigten Ausstrichpräparaten nur äußerst wenige Milzbrandbacillen. In dem einen Falle wurden von 42 Präparaten nur in zweien ganz vereinzelte Bacillen nachgewiesen. In den meisten Präparaten fanden sich trotz genauer Durchsicht keine Milzbrandbacillen, dahingegen in großer Zahl in sämtlichen Präparaten fast ausschließlich plumpe Fäulnisstäbchen mit endständigen Sporen. In den angelegten Plattenkulturen gingen in geringerer

Zahl typische Milzbrandkolonien in Reinkultur auf, während die massenhaft nachgewiesenen Kadaverbacillen unter den aeroben Verhältnissen nicht zur Entwicklung gelangten. Also auch hier gelang der Nachweis der Milzbrandbacillen leicht durch Plattenkultur, während die mikroskopische Untersuchung wegen der Bacillenarmut im Stiche ließ.

Der Nachweis der Milzbrandbacillen durch Ausstrichpräparate kann nach den obigen Ausführungen in doppelter Beziehung zu Fehlresultaten führen:

1) dadurch, daß der Nachweis durch die Formveränderungen, welche der Milzbrandbacillus unter dem Einflusse von Fäulnisregnern erleidet, unzuverlässig wird;

2) daß die Milzbrandbacillen im Blute nicht immer in der reichlichen Zahl vorhanden sind, so daß sie in Ausstrichpräparaten ohne weiteres leicht nachgewiesen werden könnten.

2. Der Nachweis der Milzbrandbacillen durch Impfung.

Bisher hat man in der Milzbranddiagnose der Impfung von kleinen Versuchstieren vor der mikroskopischen Untersuchung eine größere Beweiskraft zugemessen. Man ist noch jetzt der Ansicht, daß die für Milzbrand hoch empfänglichen kleinen Versuchstiere noch dann auf Milzbrand reagieren, wenn in Ausstrichpräparaten der Nachweis von Milzbrandbacillen mit Sicherheit nicht mehr zu erbringen ist. Von dieser Meinung ausgehend, wird z. B. auch in dem in Königsberg in Ostpreußen zur Nachkontrolle der Milzbranddiagnosen eingerichteten Laboratorium (16b) in den Fällen, in denen die mikroskopische Untersuchung Zweifel in Betreff der Diagnose bestehen läßt, die Impfung von Mäusen vorgenommen, welcher eine entscheidende Bedeutung beigelegt wird. Diese Ansicht kann ich auf Grund meiner Versuchsergebnisse als richtig nicht ansehen. Im Gegenteil, die Impfung leistet unter Umständen, worauf noch besonders eingegangen wird, weniger wie die mikroskopische Untersuchung von Ausstrichpräparaten. Durch vergleichende Untersuchungen habe ich feststellen können, daß die Verimpfung des Milzbrandmaterials an Mäuse am frühesten im Stiche läßt. In 3 Fällen versagte die Impfung bereits am 2. Tage nach dem Tode des Tieres, obwohl durch Ausstrichpräparate und Plattenkultur die Diagnose am 3. bzw. 6. Tage nach dem Tode noch mit positiver Sicherheit zu stellen war. Die geimpften Mäuse starben innerhalb 24–48 Stunden, aber es waren weder in der Milz noch an der Impfstelle Milzbrandbacillen nachzuweisen. In 2 Versuchsreihen fanden sich in Milz- und Blutaustriechen kleine, bipolar sich färbende, schweineseucheähnliche Stäbchen und in einer Coli-artige Stäbchen und plumpe Langstäbchen, die stellenweise lange verschlungene Fäden bildeten (Oedembacillen). Auch die von R. Koch (l. c. p. 55) und Kitt (l. c. p. 276) zur Vermeidung der durch anaerobe Fäulnisbakterien bedingten Mischinfektionen (malignes Oedem) empfohlene kutane Impfung der Mäuse an der Ohrspitze hatte auf den Ausfall der Impfung keinen Einfluß. Einige Mäuse überlebten die Impfung, diejenigen aber, welche nach mehreren Tagen starben, ließen in Milz- und Blutaustriechen Milzbrandbacillen nicht erkennen, sondern jene bipolaren Stäbchen. Auch die kutane Impfung von Meerschweinchen in Gestalt des Verreibens des Untersuchungsmaterials auf der rasierten Bauchhaut, eine Impfmethode, welche für den Nachweis von Pestbacillen in Fäulnisgemischen sich von großer diagnostischer Bedeutung erwiesen hat, habe ich zum Nachweise von Milzbrandbacillen in faulendem Kadaver vergleichsweise

angewandt. Solange die Milzbrandbacillen in größerer Zahl vorhanden waren, starben die Impftiere innerhalb 2—3 Tagen prompt an Milzbrand. Die Infektion von der rasierten Haut aus gelang jedoch nicht mehr, wenn die Zahl der Milzbrandkeime, welche sich durch das Plattenverfahren noch sehr leicht nachweisen ließen, bedeutend abgenommen hatte. Immerhin verdient diese Art der Impfung zur Feststellung des Milzbrandes berücksichtigt zu werden¹⁾.

Da die Verimpfung des Milzbrandmaterials in 3 Versuchsreihen schon bald nach dem Tode der Tiere ein negatives Resultat ergab, wurde von derselben bei den übrigen Versuchsproben Abstand genommen. Nur später wurde noch einmal vergleichsweise, um zu sehen, ob sich die Verimpfung von sporenhaltigem, faulem Milzbrandmaterial anders gestaltet, mit drei Proben faulenden Milzbrandmaterials, in welchem nach der Buchnerschen Methode (l. c.) durch Hinzufügen von Aqua dest., Aqua font. und 2-proz. NaCl-Lösung eine reichliche Sporenbildung herbeigeführt worden war, Impfungen an Mäusen vorgenommen. In den Ausstrichpräparaten von diesem Milzbrandmaterial konnten in einem Bakteriengemisch von Stäbchen und Kokken vereinzelte freie Sporen, aber keine Spur von Milzbrandbacillen nachgewiesen werden. Daß erstere Milzbrandsporen waren, wurde durch Plattenkultur nach vorheriger Erhitzung des Aussaatmaterials 1 Stunde lang auf 70° bewiesen. Diese Probeimpfung mit sporenhaltigem Milzbrandmaterial fiel ebenfalls bezüglich des Nachweises von Milzbrand vollkommen negativ aus. Von 6 geimpften Mäusen (3 kutan an der Ohrspitze, 3 subkutan am Schwanz) starben 4 Mäuse innerhalb 1—3 Tagen an Septikämie infolge kleiner Coli-artiger und feiner, nach Gram färbbarer Stäbchen (Mäusesep-tikämiebacillen), zwei kutan geimpfte Mäuse blieben am Leben. In den Plattenkulturen aus Herzblut und dem Exsudat an der Impfstelle gingen Milzbrandkolonien nicht auf, sondern nur jene beiden Stäbchenarten in Form von großen bläulichweißen und kleinsten durchscheinenden Kolonien.

So lange das Milzbrandmaterial rein ist und fast nur Milzbrandbacillen enthält, haftet die Impfung und die Impftiere sterben prompt. Sobald aber das Milzbrandmaterial nicht mehr frisch ist und sich Fäulnisreger in demselben angesiedelt haben, stellt der Tierkörper nicht mehr das feine Reagens auf Milzbrand dar, für welches er gehalten wird, selbst wenn die Milzbrandbacillen Sporen gebildet haben sollten. Die geringe Widerstandskraft der Milzbrandbacillen äußeren Einflüssen gegenüber, welche auch in der Konkurrenz mit den Saprophyten hervortritt, beeinträchtigt die Fähigkeit zur ungestörten Entwicklung im Tierkörper der normal empfänglichen Warmblüter, ja hebt sie vollkommen auf. Entweder sterben die Impftiere an Septikämie, wobei in Blute und in der Milz die verschiedensten Bakterien, aber keine Milzbrandstäbchen, durch Ausstrich und Kultur nachweisbar sind, und auch die Untersuchung der Impfstelle ein negatives Resultat ergibt, oder die Milzbrandinfektion kann infolge der natürlichen Resistenz der Impftiere

1) Fiscoeder hat in seinen Untersuchungen bei den mit faulem Milzbrandmaterial geimpften Mäusen etwa 6 Stunden nach der Impfung das Exsudat der Impfstelle mikroskopisch untersucht und eine Vermehrung und ein Auswachsen der Milzbrandbacillen zu langen Fäden konstatieren können. Durch diese Frühuntersuchung der Impfstelle der noch lebenden Impfmäuse gewinnt nach Fiscoeder die diagnostische Milzbrandimpfung eine größere Zuverlässigkeit. Ich habe dieses nachgeprüft, aber nicht immer bestätigt gefunden. D. Verf.

in Verbindung mit einer Abnahme der Virulenz der Milzbrandbacillen, namentlich aber wegen der antagonistischen Wirkung verschiedenartiger sekundärer Mikroorganismen nicht zur Geltung kommen, wird unterdrückt oder zur Heilung gebracht. Diese beiden Möglichkeiten des Ausganges der diagnostischen Milzbrandimpfungen mit nicht mehr reinem Material können und haben vielfach zu Trugschlüssen geführt. (Forts. folgt.)

Nachdruck verboten.

La constitution du poison diphtérique.

[Travail de l'Institut sérothérapeutique de l'État Danois, Copenhague.]

Par **Thorvald Madsen.**

Avec 4 figures.

Les travaux intenses des dernières années sur l'immunité ont établi une multitude de faits et nous ont procuré des matériaux tres nombreux dus en grande partie directement ou indirectement à Ehrlich. Par ses recherches fondamentales sur le poison diphtérique il a été le promoteur de l'étude rationnelle des relations mutuelles des toxines et antitoxines, et ce sont ses méthodes excellentes pour mesurer leurs forces qui firent voir, qu'on peut obtenir à l'aide de l'expérience physiologique, cette exactitude que demande le traitement scientifique.

Si l'on prépare une série de mélanges de la même quantité de toxine avec de quantités différentes d'antitoxine, ces mélanges injectés à des cobayes produiront des effets différents. M. Ehrlich est d'opinion que ce phénomène s'explique le plus facilement par la supposition que le poison diphtérique contient une série de substances de toxicité très inégale et d'affinité différente quant à l'antitoxine.

Dans une communication antérieure¹⁾, l'auteur a confirmé les faits expérimentaux constituant la base de la théorie primordiale de M. Ehrlich, mais des recherches ultérieures²⁾ sur la téτανολysine, très semblable au poison diphtérique, ont fait surgir des doutes, si cette explication, naturelle, tout d'abord, il faut l'avouer, pouvait être maintenue dans tous ses details.

A beaucoup d'égards, la téτανολysine se prête très bien aux recherches théoriques, parce qu'elle peut, de même que son antitoxine, être mesurée très exactement par des expériences en éprouvettes, ce qui permet des variations bien plus étendues quand à l'arrangement des expériences que pour le poison diphtérique, où la nécessité de se servir d'animaux restreint aussi le nombre d'observations.

Il fut démontré que la neutralisation de la téτανολysine pouvait être représentée par une courbe continue.

Par la continuation et l'extension de ces recherches, Arrhénius et Madsen³⁾ sont parvenus à démontrer que cette courbe correspond parfaitement à celle, représentant les rapports d'équilibre entre une substance en dissociation partielle et ses produits de dissociation. Une

1) La constitution du poison diphtérique. (Annales de l'Institut Pasteur. 1899.)

2) Ueber Tetanolysin. (Zeitschr. f. Hygiene etc. Bd. XXXII. 1899.)

3) Physical chemistry applied to toxins and antitoxins. (Festskrift ved Indvielsen af Statens Serum Institut.) Copenhagen 1902.

partie des phénomènes qu'offrent les rapports entre la tétanoly sine et l'antitétanoly sine pourra donc être expliquée d'après de simples lois physicochimiques.

Cette manière de voir était le plus soutenue par la démonstration de rapports analogues chez un poison diphtérique en état frais¹⁾.

Ce poison fut préparé du bacille américain connu, provenant de Park et Williams à New York (No. 8). On le sema dans 20 litres de bouillon-peptone préparé suivant Dean, et on le laissa en étuve pendant 13 jours à 36° (13—28 oct. 1901). Après filtration sur papier, la culture fut conservée sous toluol. Elle s'est toujours maintenue stérile.

La dose minime mortelle immédiatement après la sortie de l'étuve, était de 0,0015 c.c. Pour les déterminations, on s'est toujours servi de cobayes de 250 g. Plus tard, elle s'affaiblissait successivement, et au bout d'un an, la toxicité n'était à peu près que la moitié, la dose minime mortelle étant alors d'environ 0,003 c.c. (Tabl. I).

Table I.
Dose minime mortelle. Cobayes 250 g.

Date	Dose en c.c.	Résultat	Paralyse Temps d'incubation jours	Date	Dose en c.c.	Résultat	Paralyse Temps d'incubation jours
28/10—13/11 1901	0,001	§ ²⁾	20	11/2—5/3 1902	0,0015	+ 5 $\frac{1}{2}$	
	—	§	20		—	—	30
	0,0015	+ 5			—	—	30
	—	+ 6			—	—	
	0,002	+ 3			0,0016	—	46
	—	+ 3 $\frac{1}{2}$			—	—	
6/1—20/1 1902	0,0011	+ 4			0,0017	+ 5 $\frac{1}{2}$	
	0,0013	§	17		—	—	28
	—	§	17		0,0018	—	23
	—	§	21		0,0019	—	
	—	§	35		0,002	+ 2	
	—	§	35		—	+ 2	
	0,0014	+ 3 $\frac{1}{2}$	17		—	+ 2 $\frac{1}{2}$	
	—	§	17	22/3 1902	0,002	+ 2 $\frac{1}{2}$	21
	0,0015	+ 2			—	§	
	—	+ 3		18/4 1902	—	+ 2 $\frac{1}{2}$	
	—	+ 4			—	+ 3 $\frac{1}{2}$	
	—	+ 4 $\frac{1}{2}$		19/6 1902	—	+ 3 $\frac{1}{2}$	
	—	§	25		—	+ 4	
	0,0017	+ 6			—	—	
	—	+ 7	30	28/10—15/11 1902	0,0025	+ 3 $\frac{1}{2}$	
	—	§	30		—	—	
	0,0019	+ 2			—	—	
	0,002	+ 2			0,0026	+ 5 $\frac{1}{2}$	
	—	+ 4			0,0027	—	
	—	+ 4 $\frac{1}{2}$			0,0028	+ 5	
	—	§	30		0,0029	+ 7	
	—	§	30		0,003	+ 3 $\frac{1}{2}$	
	0,002 ²⁾	+ 2			—	+ 3 $\frac{1}{2}$	
	—	+ 4 $\frac{1}{2}$			—	+ 3 $\frac{1}{2}$	

1) Dreyer et Madsen: Studies on diphtheria toxin. (Festskrift ved Indvielsen af Statens Serum Institut.) Copenhagen 1902.

2) 0 indique que l'animal a survécu à l'expérience sans œdème, § indique que l'animal a survécu à l'expérience avec œdème, † 3 indique que l'animal est mort après 3 jours.

Par la mensuration avec du test-sérum que M. Ehrlich avait bien voulu mettre à ma disposition, L † fut trouvée égale à 0,2 c.c., et ce chiffre resta constant malgré l'affaiblissement de la dose minime mortelle (Table II).

Table II.
Détermination de L † Cobayes 250 g.

Date	J + x c.c. de poison	Résultat	Paralyse		Date	J + x c.c. de poison	Résultat	Paralyse			
			Temps d'incubation jours	Marche de la maladie				Temps d'incubation jours	Marche de la maladie		
9/1—20/1 1902	x	0	29	guéri	—	0,19	—	17	—		
	—	0	22	—		—	—				
	0,1	0	28	—		0,2	† 1 ^{1/2}			16	—
	—	0	28	—		—	† 1 ^{1/2}				
	—	0	28	—		—	† 1 ^{1/2}			—	—
	0,12	0	23	—		—	† 1				
	0,14	—	22	—		—	† 1			—	—
	0,16	—	22	mort		—	† 1				
	0,17	—	22	—		—	—			—	—
	0,18	† 5 ^{1/2}	—	—		22/3 1902	—				
—	—	16	—	—	—	† 2					
—	—	16	—	24/6 1902	—	† 3 ^{1/2}	—	—			
—	—	16	—	—	—	† 3 ^{1/2}					
—	† 5	—	—	18/11 1902	—	† 3	—	—			
—	† 5 ^{1/2}	—	—	—	—	† 3					

Avec ce poison fut instituée une série d'expériences pour déterminer ses rapports avec l'antitoxine diphtérique. Quant à cette dernière, on s'est servi de deux préparations, partie du test-sérum de Ehrlich, partie d'un sérum d'effet antitoxique pris d'un cheval non immunisé, sérum normal.

On obtint les meilleurs enseignements par une saturation partielle du poison avec l'antitoxine, ainsi qu'il fut d'abord indiqué par Ehrlich.

Les expériences furent faites de sorte qu'à la même quantité arbitrairement choisie de poison, 0,1 c.c., on a ajoutée des quantités variables de sérum, exprimées en unités d'immunisation. La toxicité de ce mélange a été déterminée par des injections à des cobayes de 250 g. Là où ce mélange contenait plus d'une dose minime mortelle, il fut établi qu'elle était la fraction minimale contenant une telle.

La courbe de neutralisation de ce poison a été déterminée deux fois, d'abord en févr.-mars 1902, alors que la dose minime mortelle était de 0,002 c.c., et plus tard, en novembre 1902, alors qu'elle s'était élevée à 0,0028—0,0029 c.c. (Table III).

Les résultats se trouvent dans le résumé ci-dessous où, dans la première colonne, n indique la quantité d'antitoxine, exprimée en unités immunisantes, ajoutée aux 0,1 c.c. de poison. Dans la rubrique suivante, x marque, combien de c.c. de mélange contiennent une dose mortelle, tandis que T indique la toxicité du mélange, c'est-à-dire, combien de doses mortelles sont contenues dans le mélange de 0,1 c.c. de toxine + n unité immunisante.

Dans les dernières colonnes, on trouvera un x et T théorique, dont le calcul sera indiqué plus bas.

Table III.

Testésérum. Fevr.-mars 1902				Testésérum. Novembre 1902				Sérum normal			
0,1 c. c. de poison + n J	Divisé par	Résultat	Paralyisie Temps d'incubation jours	0,1 c. c. de poison + n J	Divisé par	Résultat	Paralyisie Temps d'incubation jours	0,1 c. c. de poison + n J	Divisé par	Résultat	Paralyisie Temps d'incubation jours
n 0,05	50	+ 2 + 5 1/2 + 10		n 0,06	30	+ 6 1/2		n 0,075	45	+ 3	
—	55	+ 8	19	—	35	+ 7		—	47	+ 4	
—	60	+ 8	23	0,12	30	+ 6		0,15	30	+ 4	
—	40	+ 3 1/2		—	35	+ 8		—	40	+ 4	
0,1	40	+ 1 1/2		—	40	+ 6		—	45	+ 3	25
—	43	+ 4 1/2		0,18	46	+ 5 1/2	30	—	26	+ 3	
—	45	+ 4 1/2		—	30	+ 6 1/4		—	28	+ 3	
—	50	+ 8		—	35	+ 2 1/2		0,3	15	+ 4	
—	55	+ 8		—	40	+ 4 1/2		—	17	+ 3 1/2	
—	60	+ 8 1/2		0,24	18	+ 4 1/2		—	20	+ 4 1/2	20
—	30	+ 3 1/2	27	0,3	12	+ 2 1/2		0,375	7	+ 3	
0,15	35	+ 2		—	14	+ 2 1/2		—	8	+ 3	
—	40	+ 5		—	16	+ 3 1/2		0,45	2	+ 3	
—	25	+ 6 1/2		0,36	18	+ 8		—	3	+ 4	
—	30	+ 2 1/2		—	8	+ 3		—	4	+ 1	
—	35	+ 5		—	10	+ 3 1/2		—	1	+ 0	
—	40	+ 5		0,4	11	+ 6		—	2	+ 0	
—	25	+ 6 1/2	27	—	7	+ 8		—	3	+ 1	
—	30	+ 2 1/2		—	8	+ 8		—	4	+ 0	
—	35	+ 2 1/2		0,48	10	+ 3		—	1	+ 0	
—	17	+ 3 1/2	19	—	3	+ 3		—	1	+ 0	
0,25	20	+ 4		0,54	4	+ 1		—	2	+ 1 1/2	
—	25	+ 8		—	1	+ 2		0,6	—	+ 0	
—		+ 8		—	2	+ 1		—	—	+ 0	

n	Résumé A.				Sérum normal		Calc.	
	Testsérum				x	T	x	T
	févr.-mars	novembre	x	T				
0	0,002	50	0,0029	35		0,0015	66,67	
0,05	0,002	50				0,00173	57,8	
0,06			0,0029	35		0,00179	56	
0,075					0,0022	45	0,0019	53
0,1	0,0022	45				0,00207	48	
0,12			0,0029	35		0,00219	45	
0,15	0,0022	40			0,0025	40	0,0025	40
0,18			0,0029	35		0,00288	36	
0,2	0,0033	30				0,0032	31	
0,225					0,0036	28	0,0037	27
0,24			0,0056	18		0,00408	24,5	
0,25	0,005	20				0,0044	22,9	
0,3	0,0067	15	0,0071	14	0,0059	17	0,0066	15,3
0,35	0,01—0,012	10—8				0,011	9,1	
0,36			0,013	8		0,0136	7,5	
0,375					0,0143	7	0,0147	6,8
0,4	0,017	6	0,014	7		0,019	5,3	
0,45	0,013	3			0,05	2	0,03	3,4
0,48			0,033	3		0,0366	2,8	
0,54			0,1	1		0,06	1,7	
0,6			0,1	1	0,1	1	0,067	1,5

Le résultat est inscrit dans un système de coordonnées où l'on a marqué n le long de l'axe de l'abscisse, et T, la toxicité, le long de l'axe des coordonnées (Fig. 1).

Ces courbes, correspondant sur la plus grande partie de leur parcours, présentent une grande ressemblance aux courbes analogues de la tétanolysine. Elles font penser qu'aussi la combinaison diphtérique avec l'antitoxine a subi une dissociation partielle.

On voulut alors savoir, si l'une de ces formules valables en ce cas :

$$\left\{ \frac{\text{Toxine libre}}{\text{vol.}} \right\} \left\{ \frac{\text{Antitoxine libre}}{\text{vol.}} \right\} = K \left\{ \frac{\text{Toxine-Antitoxine}}{\text{vol.}} \right\}^2$$

s'adapteraient aux résultats obtenus.

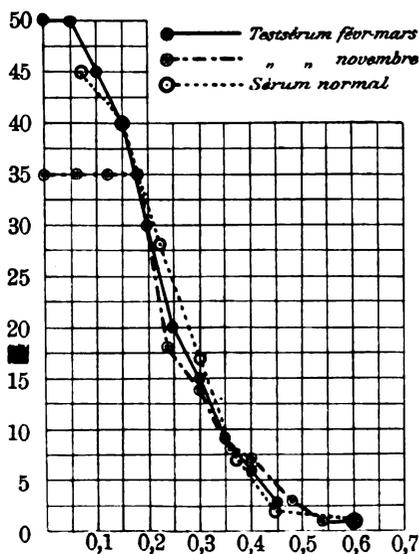


Fig. 1.

La mesure de la quantité de toxine libre étant la dose minime mortelle pour des cobayes de 250 g; et les mélanges injectés pouvant toujours être regardés comme dilués dans ces 250 g, on a omis le volume du calcul, ce qui, sans doute, pourra se faire sans faute essentielle.

La quantité de toxine libre est évaluée à 0,0015 c.c., c'est-à-dire la dose minime mortelle du poison avant son affaiblissement.

La quantité de la toxine fixée s'exprime par la différence entre la quantité de poison ajouté et la quantité libre: $x - 0,0015$.

La quantité de l'antitoxine fixée est la même.

La quantité d'antitoxine dans la solution peut s'exprimer par $n \cdot x \cdot p$, où p indique le multiple

de 0,1 c.c. équivalent à une unité immunisante. On obtient la quantité d'antitoxine libre en déduisant de ce chiffre la valeur ci-dessus trouvée de l'antitoxine fixée.

L'équation sera donc la suivante :

$$0,0015 [n \cdot x \cdot p - (x - 0,0015)] = K (x - 0,0015)^2.$$

Pour la détermination du chiffre d'équivalent p , et de la constante de dissociation K , nous avons autant d'équations que d'observations pour x . On trouve donc dans la première série d'observations avec le testsérum, 9, et dans celle avec le sérum normal, 7. — La meilleure évaluation fut $p = 2,7$, et $K = 0,015$.

A l'aide de ces valeurs, on a calculé les chiffres pour x et T des deux dernières colonnes du résumé A. Excepté les déterminations de n , depuis 0—0,1, où il y a des circonstances spéciales, la correspondance entre les chiffres obtenus par calcul, et par observation est parfaitement satisfaisante, les écarts se trouvant en dedans de la faute d'observation. Ceci ressort clairement de la figure 2, où la courbe indique les valeurs théoriques, tandis que les observations obtenues du testsérum sont marquées respectivement par \bullet et \circ , et celles du sérum normal par \odot , (Fig. 2.)

Ainsi, dans ce poison diphtérique en état frais, les phénomènes de neutralisation s'expliquent tout naturellement, en admettant la présence d'une seule substance réagissant contre l'antitoxine.

Pour la neutralisation, on s'est servi, partie du testsérum de Ehrlich, partie du sérum retiré d'un cheval tout à fait normal. Ce cheval n'a jamais servi à l'immunisation diphtérique. Il est donc d'un intérêt spécial de voir que les deux courbes en dedans des fautes d'observation suivent le même parcours; il semble donc qu'il n'y ait lieu d'établir aucune différence entre l'antitoxine normalement existant, et celle obtenue artificiellement par l'immunisation.

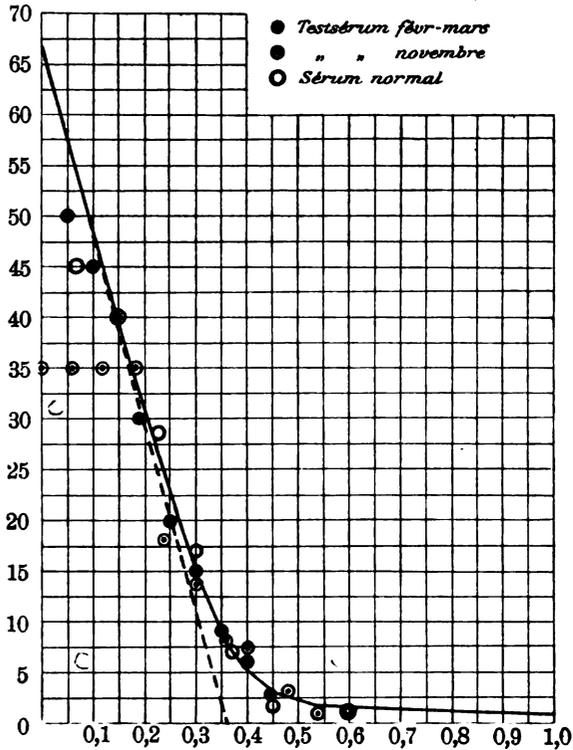


Fig. 2.

Pendant les recherches antérieures sur les poisons diphtériques, un phénomène avait surtout attiré l'attention, et fait supposer leur constitution complexe. En préparant un tel mélange de toxine et d'antitoxine, qu'aucune dose mortelle complète n'était libre, ce mélange produisit des effets spéciaux: œdème sans nécrose, des parésies tardives, très rarement observées après des injections de quantités de poisons un peu au-dessous de la dose minime mortelle. Dans ce cas, on réussit toutefois à démontrer que le poison seul, sans antitoxine, pouvait provoquer des cas tardifs analogues à ceux produits par des mélanges de toxine et d'antitoxine. Ces effets tardifs étaient surtout des paralysies typiques, comme j'en ai décrit dans une autre mémoire, mais on observait encore, une ou deux semaines plus tard, d'autres phénomènes subséquents, voire un fort amaigrissement accompagné d'un relâchement musculaire marquée surtout par une grande difficulté à se retourner quand l'animal avait été placé sur le dos.

Il ressort de la formule, qu'une molécule de toxine se combine avec une molécule d'antitoxine pour constituer deux molécules d'une nouvelle combinaison, toxine-antitoxine. Si, à une quantité donnée de toxine, on ajoute une quantité relativement petite d'antitoxine, cette dernière sera presque entièrement fixée; le surplus de la toxine restera libre. Au contraire, presque aucune antitoxine ne sera libre, parce que, dans ces proportions quantitatives, la „toxine-antitoxine“ n'est que très faiblement dissociée. A mesure qu'augmente la quantité d'antitoxine, une quantité de plus en plus grande de la toxine sera fixée, mais, en même temps, la toxine-antitoxine se dissociera de plus en plus, de sorte qu'il existera toujours de la toxine et de l'antitoxine à côté l'une de l'autre.

On voit facilement que les idées courantes sur la neutralisation de la toxine par l'antitoxine ne sauraient être maintenues. Suivant ce qui précède, la quantité d'antitoxine équivalent à 0,1 c.c. de toxine est $1/p = 0,37$ unité immunisante, tandis qu'il ressort du tableau III qu'il faut se servir de deux unités immunisantes pour faire disparaître tout effet toxique sur des cobayes.

Si la combinaison toxine-antitoxine ne se dissociait pas, la courbe de neutralisation serait une ligne droite, la ligne pointillée de la fig. 2, comme c'est le cas pour la combinaison d'un acide fort avec une base forte. Dans ce cas, 0,37 unité immunisante ferait entièrement disparaître l'effet des 0,1 c.c. de poison. Toutefois, tel n'est pas le cas: à cause de la dissociation, une quantité assez considérable de toxine devient libre, env. 7 doses mortelles. A mesure qu'on ajoute de l'antitoxine, la quantité de toxine libre va diminuant, mais ce décroissement se fait de plus en plus lent, et en théorie, il reste toujours de la toxine libre, quelque grande que soit la quantité ajoutée d'antitoxine. Ceci ressort de la courbe de neutralisation qui est une hyperbole, se rapprochant à son asymptote.

On voit donc qu'en concevant les toxones comme de la toxine-antitoxine dissociée on aura une explication naturelle de la longue „zone de toxone“ se trouvant chez ce poison diphtérique et chez d'autres. En considérant le tableau III, on verra que les mélanges depuis 0,6 jusqu'à 2 unités immunisantes montrent tous un effet toxique diminuant par degrés.

A ceci correspond aussi cette circonstance, que leurs effets ne restent pas les mêmes vis-à-vis des différents animaux.

Des expériences antérieures ont démontré¹⁾, qu'un mélange de toxine avec l'antitoxine restant sans effet sur des cobayes, produit des paralysies chez les lapins, et qu'un mélange ne provoquant que des cas tardifs chez les cobayes, tue les lapins en peu de jours. — Il serait difficile de comprendre cette différence, si l'on régarde la toxone comme une substance, essentiellement différente de la toxine, tandisque l'explication en devient aisée, en ne supposant qu'une différence quantitative. Du reste, il serait à present sans doute assez difficile de donner un exposé parfaitement lucide des effets des toxones sur les différents animaux à cause de l'insuffisance des matériaux. Toutefois, on peut supposer qu'il existe une différence entre les effets d'une petite dose de toxine, et d'un mélange de toxine avec de l'antitoxine qui en plus de la même quantité de toxine libre contient de la „toxine-antitoxine“, et, encore, de l'antitoxine libre.

De plus, il est permis de croire qu'un tel mélange offrirait des effets différents dans différents organismes. Tandisque la dose minime mortelle de ce poison restait presque la même pour les cobayes de 250 g et pour les lapins de 1500 g la différence était grande pour L †, 1 unité immunisante + 0,2 c.c. de poison étant mortelle pour les cobayes, tandisque déjà un mélange de 1 unité immunisante + 0,14 c. c. de poison tuait les lapins.

En supposant qu'une quantité et absolument et relativement plus considérable de toxine est fixée chez le lapin que chez le cobaye, l'équilibre entre la toxine libre, l'antitoxine libre, et la toxine-antitoxine sera bien plus exposé à être déplacé chez un lapin que chez un cobaye. Pour rétablir l'équilibre changé par la fixation de la toxine libre, la toxine-antitoxine devra être ultérieurement dissociée, de la nouvelle toxine deviendra libre, et pourra être fixée, de sorte que la même mélange pourra présenter des effets bien plus toxiques sur l'un que sur l'autre animal.

La vieille dispute sur l'existence d'un point de neutralisation ou non, se résoudra, sans doute, facilement, par l'interprétation précédente; en s'y basant, on comprendra facilement qu'un mélange de toxine avec de l'antitoxine restera, à une dose donnée, absolument sans effet, tandis qu'un multiple produira de faibles effets toxiques (paralysie), et qu'une dose encore plus forte sera mortelle²⁾.

Le fait que les toxones présentent des effets immunisantes au même degré que la toxine seule, s'adapte sans doute aussi bien à ce que nous venons d'avancer, qu'à l'idée de l'existence d'une substance particulière à avidité plus faible que la toxine.

Dans tout le développement antérieur, le but a été, d'interpréter les faits observés d'une manière que se rapproche le plus possible à un phénomène connu, ce qui n'a présenté aucune difficulté quant à la première partie de la courbe; toutefois quant à la region de toxone il-y-a quelque désaccord que je vais aborder.

Ici nous trouvons que la toxicité observée des mélanges de toxine et d'antitoxine se trouve constamment un peu au dessous de la toxicité calculée (voir aussi la courbe suivante No. 4). Il est peu probable que ce phénomène soit dû à des fautes d'expériences; peut-être qu'il est dû

1) Dreyer und Madsen, Ueber Immunisierung mit den Toxonen des Diphtheriegiftes. (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XXXVII. 1901. p. 250.)

2) Dreyer und Madsen, l. c.

à de tels écarts des prémisses théoriques simples qu'on voit fréquemment dans toute une série de réactions, quand elles se font en concentration élevée.

Il est aussi permis de croire que d'autres substances du sérum que l'antitoxine pourront jouer un rôle quelconque.

Les relations assez simples trouvées chez un poison frais s'effacent à mesure que s'affaiblit le poison. Outre la diminution de la force létale (la formation des „prototoxoïdes“), dont on parlera plus tard, il se produit aussi un affaiblissement de sa faculté paralytique. Lorsque la dose minime létale était montée au double, on observa aucun cas de paralysie après une quantité non létale de poison. Au cas contraire elles s'observaient toujours, bien qu'à un moindre degré après les mélanges de toxine avec une quantité relativement grande d'antitoxine, pour lesquels je conserverai provisoirement et pour être bref, le nom de „toxones“.

Entre la toxone et la toxine on retrouva en outre cette différence que la dernière produit la nécrose avec alopecie, tandis que les toxones ne provoquent, qu'un œdème mou assez fugitif sans conséquence. Ceci s'explique peut-être par la différence de la rapidité de réaction existant sans doute entre toxine et toxone, ainsi qu'il a été démontré antérieurement¹⁾. Nous savons que pour la tétanolysine la vitesse de réaction entre la toxine et l'antitoxine baisse rapidement en présence de grandes quantités d'antitoxine (Arrhenius et Madsen), conformément les „toxones“ de la tétanolysine se fixent plus lentement aux érythrocytes, que la tétanolysine seule (Madsen), et les „toxones“ du poison diphtérique sont fixées bien plus tardivement dans l'organisme que le poison seul (Dreyer).

On pourra croire que ceci est dû à ce que la présence de la toxine-antitoxine ou de l'antitoxine fait baisser la vitesse de réaction de la toxine de même façon que p. ex. l'hydrogène sulfurique déprime la rapidité à la réaction des solutions colloïdales de platine (Bredig).

Si la toxine est injecté subcutanément, elle se lie sans doute rapidement au tissu et provoque une forte réaction, tandis que la „toxone“ en conséquence de sa moindre vitesse de réaction n'est fixée que faiblement et avec lenteur, et qu'elle réussit ainsi à se diffuser en s'en allant et à disparaître de l'endroit injecté, de sorte que l'effet local sera de la même nature que des doses minimes de toxine.

On voit de la fig. 2 que la toxicité du mélange de 0,1 c. c. de poison avec une quantité d'antitoxine, n, moindre de 0,12 unité immunisante, est considérablement au-dessous du calcul. Si l'on compare les courbes déterminées au printemps et en automne de 1902, on voit qu'il s'agit d'un procès progressif. En automne de 1902, la dose minime mortelle était de env. 0,0029 c. c., et les 0,1 c. c. contenaient alors en tout, env. 35 doses mortelles. Les 0,18 unités immunisantes ne produisaient aucun abaissement dans la toxicité. En augmentant ensuite la quantité d'antitoxine, on obtint une courbe essentiellement correspondante à celle déjà trouvée.

Suivant Ehrlich, ce phénomène peut être expliqué par cette supposition que le poison diphtérique contient une substance la „prototoxine“ d'une plus grande affinité pour l'antitoxine que le reste de la toxine. Tandis que la faculté de fixer l'antitoxine (liée au groupe haptophore

1) Madsen, Sur les toxones. (XIII. Congrès intern. de méd. Paris 1900.)

d'Ehrlich) reste constante, l'élément toxique (le groupe toxophore d'Ehrlich) est très labile, de sorte que la prototoxine se change graduellement en une modification atoxique, la toxoïde, à faculté non modifiée de fixer l'antitoxine. A ceci correspond encore que L † est restée constante malgré l'accroissement continu de la dose minime mortelle.

Une telle formation de prototoxoïde qui se trouve aussi chez la tétanolysine, est un phénomène constamment observé quand on conserve les poisons pendant quelque temps. Cette formation semble fréquemment comprendre presque la moitié de la toxicité. Voir aussi les courbes correspondantes pour 2 autres poisons A (fig. 3), et C (fig. 4).

Pour examiner, si la formule indiquée s'applique aussi à d'autres poisons diphtériques qu'à celui décrit, on calcula une série d'expériences provenant de recherches antérieures, et touchant un autre poison C¹⁾. Ce dernier a été préparé à l'aide d'un bacille diphtérique que M. Ehrlich voulut bien mettre à notre disposition.

Immédiatement après la sortie de l'étuve, en 1898, la dose minime mortelle était de 0,005 c. c., mais elle monta plus tard jusqu'à 0,0086 c. c. Les expériences avec saturation partielle furent faites de sorte qu'à une dose de 0,6 c. c. de poison, on ajoutait de quantités variables du test-sérum de Ehrlich.

Les résultats sont indiqués dans le résumé ci-dessous, où les entêtes ont la même signification que plus haut.

Résumé B.				
obs.			calc.	
n	x	T	x	T
0	0,0088	68	0,005	120
0,15	0,0088	68	0,0068	88
0,25	0,0088	68	0,00895	67
0,35	0,0125	48	0,013	46
0,5	0,033	18	0,032	19
0,53	0,04	15	0,0405	15
0,55	0,046	13	0,0478	13
0,6	0,075	8	0,071	8
0,65	0,1	6	0,1	6
0,7	0,2	3	0,133	4,5
0,725	0,6	1	0,15	4

L'expression graphique se trouve dans la fig. 4, où la ligne marque la courbe de neutralisation calculée et ○ les observations réelles. Fig. 4. Les observations pour $n = 0, 0,15$ et $0,25$ donnèrent le même x (prototoxoïde). En traitant de même façon qu'antérieurement les autres observations, on obtint le chiffre d'équivalent $p = 1,8$ et la constante de dissociation $K = 0,012$. Avec ces chiffres, les valeurs de x et de T dans les deux dernières colonnes ont été calculées; la correspondance entre les valeurs observées et celles calculées est satisfaisante, excepté pour les deux dernières.

Le rapprochement entre les constantes de dissociation K pour chaque poison est donc considérable, 0,015 et 0,012. Quant au chiffre d'équivalent p , une unité immunisante équivaut à $2,7 \times 0,1$ c. c. du premier

1) Madsen, Om Difterigiftens Konstitution. (Oversigt over D. kgl. Danske Vidensk. Selsk. Forhandl. 1899.)

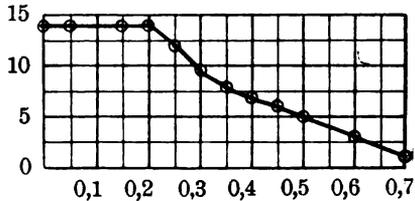


Fig. 3.

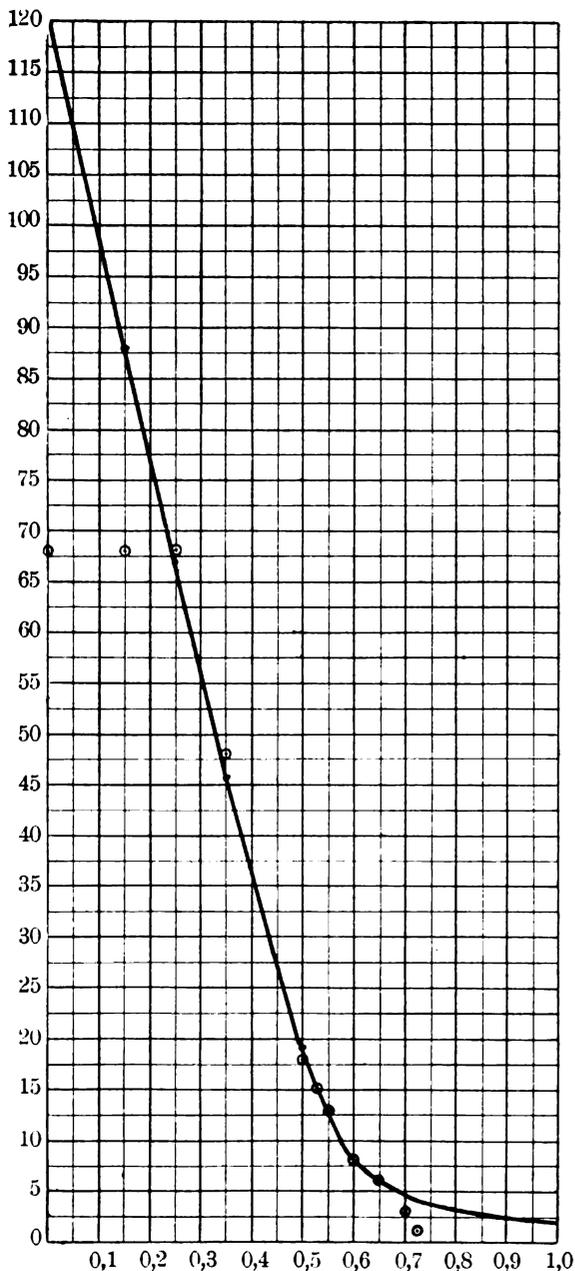


Fig. 4.

nous savons, combien d'unités de toxine, p , multiplié par la quantité de poison employé, doit contenir, on peut calculer la valeur réelle de p et de J (l'unité immunisante).

Par la démonstration que la combinaison de la toxine avec l'antitoxine

poison décrit, et à $1,8 \times 0,6$ c. c. du dernier. Ces quantités de poisons contenaient avant l'affaiblissement, respectivement 180 et 216 doses minima mortelles. La correspondance est assez satisfaisante. Si la différence est due à des fautes d'expérience ou peut-être à un abaissement de l'unité immunisante pendant les quatre ans écoulés entre les deux déterminations, voilà ce qui ne peut être établi sur la base des matériaux actuels.

Les recherches précédentes nous mettent à même de retrouver, à l'aide de la courbe de neutralisation, notre unité actuelle d'antitoxine, même si, par hasard, elle se perd.

La condition en est que nous déterminons, avec une exactitude suffisante, combien d'unités de toxine, calculées d'après le poison non affaibli qui équivaut à notre unité immunisante actuelle (ce chiffre semble se trouver autour de 200).

Veut on alors déterminer, combien grande est la quantité d'une antitoxine inconnue équivalente à notre unité actuelle immunisante, on trace la courbe de neutralisation de l'antitoxine en question, et l'on trouvera ainsi une valeur arbitraire de p . Puisque

suit la loi de Guldberg et Waage (loi de l'effet des masses), les derniers doutes que l'action mutuelle de ces substances soit de nature chimique, doivent disparaître.

Sans doute, une telle manière de voir, dont la justesse a pu être constatée vis-à-vis de la tétanolysine et du poison diphtérique, s'adapte à un grand nombre de corps et à leur anticorps.

Nachdruck verboten.

Diplococcus intracellularis meningitidis (Weichselbaum) in the nose. Report of a case without Meningitis and review of the literature.

[From the Clinico-Pathological Laboratory of the Massachusetts General Hospital. Dr. J. H. Wright, Director.]

By **Frederick T. Lord, M. D.**, Boston.

Physician to the Out-Patient Department, Massachusetts General Hospital.

I.

Among 21 cases in which the nose was examined for bacteria during the winter of 1902 and 1903, the following case is specially mentioned because of the rarity of the bacteriological findings.

The patient, a physician in daily attendance in the Throat Room of the hospital, had a severe rhinitis for one week. The process began as an ordinary coryza, with lacrymation, headache, and prostration. The nasal secretion was at first watery, becoming purulent after a few days. With the more abundant discharge, the general symptoms did not abate, and the patient found difficulty in performing his work. The temperature was slightly elevated for the first two weeks, occasionally reaching 102 degrees F. Beyond a slight cough and headache at times, there were no symptoms of other disease.

Examination of the nose, Jan. 28, 1903, showed congestion of the mucous membrane throughout and profuse muco-purulent discharge.

The patient gradually recovered. The nasal discharge was purulent for about one week. The rhinitis lasted in all about three weeks, the general symptoms somewhat longer.

The nasal secretion was examined Jan. 28 and Feb. 7. The bacteriological findings were practically the same in both examinations.

Bacteriological examination of the nasal secretion.

a) By cover-glass preparations: Smears from the nasopharyngeal secretion showed the presence of a few Gram staining organisms. Besides these, there were Gram decolorizing diplococci, composed of paired hemispheres within the leucocytes and free. The sputum failed to show the presence of similar organisms.

b) By cultures: A sterile platinum loop was smeared over the surface of the upper nasal cavity and the adherent nasal secretion washed off in sterile bouillon. From this bouillon emulsion, cultures were made on plain agar smeared with defibrinated horse blood.

After 24 hours in the incubator, the blood agar showed numerous colonies composed of cocci and diplococci, decolorizing by Gram's method

of staining. Besides these, there were a few colonies of Gram staining diplococci, which on further observation in pure culture, proved to be pneumococci.

The Gram decolorizing diplococci were isolated in pure culture and their growth observed on different media. They were morphologically like the *Gonococcus*, grouped for the most part in pairs and occasionally in tetrads. The individual cocci were nearly hemispherical. When grouped in diplococci or tetrads they were somewhat kidney-shaped, with the flattened sides apposed and a well defined unstained interval between them. There were many single cocci with considerable variation in size and intensity of staining. In the cover-glass preparations from cultures, the cocci were frequently observed in clusters, but there was no evidence of chain formation, nor any appearance of capsules.

c) By sub-cultures: On Blood Serum, there were slightly convex, moist, viscid, colorless, shining colonies at times confluent. Isolated colonies were not usually above 2 millimeters in diameter.

On Agar-Agar, after 24 hours in the incubator, the colonies reached a diameter of about 2 millimeters. They were flat, shining and grayish-white by both reflected and transmitted light. When observed under the hand-lens, the borders of these colonies were nearly or quite round and rose abruptly from the surface of the medium. A very slight increase in the size of the colonies was apparent after longer incubation. Under the low power of the microscope, the colonies were very slightly granular or homogeneous, and never coarsely granular like *Gonococcus* or *Micrococcus catarrhalis*.

On Plain Agar Slants, smeared with defibrinated horse blood, the growth was similar to that on plain agar, but more luxuriant.

On Potato, no growth was visible even with the hand-lens. Examination of the material removed by the platinum loop, however, showed numerous Gram decolorizing cocci and diplococci, frequently in tetrads.

In Sugar Agar Stab, there was a growth along the line of inoculation, but feebly at the deeper parts. On the surface about the point of puncture, there was a grayish white, slightly convex growth with a slightly irregular margin, rising abruptly from the surface of the medium.

On Gelatine Slants, at room temperature (21 degrees C), multiplication of the transplanted material was doubtful even after many days.

In Litmus Milk, there was no visible change in reaction, though growth of the cocci was apparent.

d) By Gram's method of staining: On all culture media as well as in fresh specimens, the organism readily and constantly decolorized by Gram's method of staining.

e) By animal inoculation: Twenty-five minims of a bouillon emulsion, made from a 24 hour growth on blood-serum (fourth generation), were injected into the peritoneal cavity of a guinea pig. The animal would not take food for 24 hours, but did not die.

The following characteristics of the organism are noteworthy: In cover-glass preparations from the fresh material, extra- and intracellular diplococci were found. They decolorized by Gram's method of staining and were morphologically like the *Gonococcus*. Examination of pure cultures showed the presence of cocci, varying considerably in size, frequently arranged as diplococci, and at times in tetrads, constantly decolorizing by Gram's method of staining. Their growth on agar-agar was in grayish-white, moist, very finely granular or structureless, discrete

or confluent colonies, never reaching a large size. There was very slight growth in the depth of sugar agar stab. Growth at room temperature was doubtful or negative. The organism was non-pathogenic.

No attempt was made at cultivation beyond the fourth or sixth generation.

From its morphology, staining and cultural peculiarities, the coccus is regarded as the *Diplococcus intracellularis meningitidis* of Weichselbaum¹⁾.

As the *Gonococcus* will not grow through successive generations on other than albumen containing media (ascites-, hydrocele-agar, etc.) it is readily excluded.

The *Micrococcus catarrhalis* differs in essential particulars from the *Meningococcus*, though some strains may be confounded with it, unless great care is taken in the differentiation of the colonies. Since the excellent paper by Ghon, Pfeiffer and Sederl²⁾, I have found this organism in 12 cases of bronchitis from the Out-Patient Department. After several days on agar, the *Micrococcus catarrhalis* grows into much larger whitish gray colonies. These are mortar-like rather than moist, are quite coarsely granular and have a very irregular margin. Many of the colonies show a raised central part, which with the irregularly margined flat more or less transparent periphery is very striking. The *Micrococcus catarrhalis* grows readily at room temperature and much more luxuriantly on all culture media than the *Meningococcus*.

Sporadic cerebro-spinal meningitis due to the *Meningococcus* of Weichselbaum, at the Massachusetts General Hospital since the epidemic in 1898.

The source of contagion in this case is not clear. In none of the other cases from the Throat Room in which cultures were taken were meningococci found.

Since the epidemic in Boston in 1898, from which 111 cases were reported by Councilman, Mallory and Wright³⁾, the *Diplococcus intracellularis meningitidis* has been obtained from the meninges in six cases of meningitis, at the Massachusetts General Hospital. These cases have occurred at wide intervals and we are not now in an epidemic of cerebrospinal meningitis. Three other cases of meningitis have come to autopsy at a late stage of the disease. From the anatomical findings and the absence of important bacteria in the exudate of these cases, Dr. Wright considers that they also were probably due to the *Meningococcus*.

II.

Meningococcus in the nose, with and without meningitis.
Review of the literature.

In 1887, Weichselbaum⁴⁾ published two cases of meningitis due to the *Pneumococcus* and six cases due to an organism which from its

1) Weichselbaum, Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis. (Fortschritte der Medizin. Bd. V. 1887. No. 18. p. 573.)

2) Ghon, Pfeiffer und Sederl, *Micrococcus catarrhalis*. (Zeitschr. f. klin. Med. Bd. XLIV. 1902. p. 262.)

3) Councilman, Mallory and Wright, Epidemic cerebro-spinal meningitis and its relation to other forms of meningitis. (Report of the State Board of Health of Massachusetts. 1898.)

4) Weichselbaum, loc. cit.

form and position he gave the name of *Diplococcus intracellularis meningitidis*. In one of these six latter cases (the fifth in the series) he notes that, "in the pus of the nasal cavity the same organisms were found, but besides these many other bacteria". Though the cultural peculiarities of the meningococci obtained from the cerebro-spinal fluid were carefully described, no cultures were made of these organisms found in the nose. We now know that the *Micrococcus catarrhalis*, frequently present in the respiratory tract, cannot be told from the *Diplococcus intracellularis meningitidis* on purely morphological grounds. Thus this and many other subsequent cases, recorded in the literature as nasal infection with the *Meningococcus*, are not acceptable because of insufficient data to exclude *Micrococcus catarrhalis*.

The definiteness of the type of organism described by Weichselbaum as the *Diplococcus intracellularis meningitidis* has been abundantly confirmed by other observers. The following writers differ only in minor details concerning its cultural peculiarities: Kiefer¹⁾, Kister²⁾, Herrick³⁾, Hirsch⁴⁾, Berdach⁵⁾, Bonhoff⁶⁾. The most notable confirmations of Weichselbaum's observations, however, are by Councilman, Mallory and Wright⁷⁾ and Albrecht and Ghon⁸⁾.

In 1895, Jaeger⁹⁾ see also¹⁰⁾ ¹¹⁾ ¹²⁾ ¹³⁾ called attention to the *Diplococcus intracellularis Meningitidis* as a cause of epidemic cerebrospinal Meningitis. The organisms described by him, however, differed essentially from Weichselbaum's in the presence of capsules, the growth in long or short chains and the failure to decolorize by Gram's method of staining. Such deviations, in view of the abundant confirmation of Weichselbaum's observations, naturally suggest that Jaeger's organism was not the true *Diplococcus intracellularis meningitidis* (Weichselbaum) as pointed out by Albrecht and Ghon in

1) Kiefer, F., Zur Differentialdiagnose des Erregers der epidemischen Cerebrospinalmeningitis und der Gonorrhöe. (Berliner klin. Woch. 1896. p. 628.)

2) Kister, Jul., Ueber den Meningococcus intracellularis. (Centralbl. f. Bak. u. Parasit. Bd. XX. 1896. p. 148.)

3) Herrick, J. B., On the existence of epidemic cerebrospinal meningitis in Chicago with report of a case with autopsy. (Journal of the American Medical Ass. Vol. XXXI. 1898. p. 20.)

4) Hirsch, J. L., A report of four cases of epidemic cerebrospinal meningitis, with special reference to the value of lumbar puncture as a means of diagnosis. (New York Medical Journal. Aug. 19. 1899.)

5) Berdach, J., Bericht über die Meningitis-Epidemie in Trifail im Jahre 1898. (Deutsches Archiv f. klinische Med. Bd. LXV. 1899. p. 449.)

6) Bonhoff, H., Ueber einen Fall von Cerebrospinalmeningitis und den *Diplococcus intracellularis*. (Münchener medizinische Woch. 1901. No. 3. p. 89.)

7) Councilman, Mallory and Wright, loc. cit.

8) Albrecht and Ghon, Ueber die Aetiologie und path. Anat. der Meningitis cerebrospinalis epidemica. (Wiener klin. Woch. 1901. No. 41. p. 984.)

9) Jaeger, H. Die Transportmittel gewisser Infektionsstoffe und Vorschläge zur Vernichtung derselben am Krankenbette, im Haushalt, im Verkehr. (Dtsche med. Woch. 1894. No. 18. p. 409.)

10) Zur Aetiologie der Meningitis cerebrospinalis epidemica. (Zeitschrift f. Hygiene. Bd. XIX. 1895. p. 351.)

11) Epidemiologisches und Bakteriologisches über Cerebrospinalmeningitis. (Dtsche med. Woch. 1899. No. 29. p. 472.)

12) Die Cerebrospinalmeningitis als Heeresseuche. (Bibliothek von Coler. Herausgegeben von O. Schjerning.) Berlin (A. Hirschwald) 1902. (Quoted from Jaeger.)

13) Zur Frage der morphologischen und biologischen Charakterisierung des Meningococcus intracellularis. (Centralbl. f. Bak. I. Abt. Orig. Bd. XXXIII. 1902. No. 1. p. 23.)

their excellent work¹). Other observers, regardless of the cultural peculiarities of Weichselbaum's organisms and following Jaeger, have likewise recorded cases which though they may have been due to the *Meningococcus* do not so appear from the bacteriological reports. Such cases with the deviations which seem to exclude them as well as those based solely on morphology are mentioned later, so far as they relate to nasal infection.

The three following cases, on the other hand, from the careful description of the cultural peculiarities of the organisms and their similarity to the *Meningococcus* of Weichselbaum and others, are regarded as proved beyond question. In one of these cases, the meningococci were found in the nasal secretion of a case with meningitis. The two other cases were without symptoms of meningitis.

Kiefer²) experimented for six to eighth days on the cultivation of the *Meningococcus*, comparing its growth with the *Gonococcus*. He himself suddenly acquired a severe purulent rhinitis, with slight headache, nervousness, and uncomfortable drawing sensation in the neck. His temperature was normal. Examination of the nasal pus in fresh specimens and by cultures demonstrated typical *Diplococcus intracellularis meningitidis*, with other bacteria. The rhinitis lasted for 14 days and the general symptoms somewhat longer.

Albrecht and Ghon³) in one of the cases of meningitis which died on the third day, found organisms in the nasal and naso-pharyngeal secretions, which they proved by cultures to be *Meningococci*. Of 15 cases which they investigated outside of the epidemic, they cultivated, from the naso-pharyngeal secretion of a man whose child had died several days before of meningitis, isolated colonies of meningococci.

The following cases are not accepted as proved, because the diagnosis has been made from morphology alone, because of too great deviation from Weichselbaum's *Meningococcus* in cultural peculiarities, or because of insufficient data in the description to rule out *Micrococcus catarrhalis*.

Weichselbaum's case⁴) has already been mentioned. He depended solely on morphology in the identification of the cocci found in the nasal secretion.

Jaeger, in 1894⁵), found the *Diplococcus intracellularis meningitidis* in the nasal secretion on handkerchiefs used by four out of five patients with meningitis. "In the fifth case the handkerchief was examined for the first time six weeks after its use." *Meningococci* were obtained in pure culture. Again, in 1895⁶), he obtained a pure culture of *Meningococcus* from the nose of a case with meningitis.

The cultural peculiarities of the organisms found by Jaeger in the nasal secretion of these cases are not described. Albrecht and Ghon⁷) found that meningococci could not withstand drying at whatever temperature for more than 24 hours. Moreover, in his description of meningococci obtained from the spinal canal⁶), Jaeger saw capsules

1) Albrecht und Ghon, loc. cit.

2) Kiefer, loc. cit.

3) Albrecht und Ghon, loc. cit.

4) Weichselbaum, loc. cit.

5) Jaeger, loc. cit. (Dtsche med. Woch. 1894. No. 18. p. 409.)

6) Jaeger, loc. cit. (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. XIX. 1895. p. 350.)

7) Albrecht und Ghon, loc. cit. (Wiener klin. Woch. 1901. No. 41.)

about the organisms in sections of tissue, in fresh preparations and in cultures. They decolorized by Gram's method of staining in sections of tissue, but stained by Gram's method in cultures and in cover-glass preparations from fresh material. In cultures there were many short chains, in two cases, chains of 20—30 segments. As such peculiarities diverge widely from the accepted type of Meningococcus, Jaeger's cases must be excluded.

Scherer in 1895¹⁾ found the Meningococcus in the nasal secretion of 18 consecutive cases of meningitis and in 2 of 50 cases without meningitis. In many of these cases the diagnosis was made by morphology alone. He follows Jaeger in the recognition of capsules and recommends Gram's method of staining and cultures only in doubtful cases. The cultures are not described.

Huber, in 1897²⁾, reports the finding of meningococci in the nasal secretion of a case of meningitis, without the confirmation of cultures.

Heubner, in 1897³⁾, mentions that his assistant Slavyk had demonstrated meningococci in the nasal secretion of several healthy children. In both these and a case with tubercular meningitis, in which he found the Meningococcus in the nasal secretion, reliance was apparently upon the appearance of fresh specimens.

Schiff, in 1898⁴⁾, having found the Meningococcus in the nasal secretion of one case with tubercular meningitis and a second with cerebro-spinal meningitis due to the Meningococcus was led to investigate the nasal secretion in 27 cases without meningitis. He obtained positive cultures in 3 of the 27 cases. From the inconstant reaction of his organisms to Gram's method of staining and the appearance of short chains in his cultures, his results cannot be regarded as conclusive.

Antony and Ferré, in 1898⁵⁾ in the examination of a fresh specimen of nasal secretion from one out of six cases of meningitis found „Microcoques capsulés, en grains de café, ne prenant pas le Gram, c'est-à-dire d'un organisme ayant l'aspect du meningocoque“.

Councilman, Malory and Wright, in 1898⁶⁾, were unable to cultivate the organisms resembling the Meningococcus which they found in the nasal secretion of 10 of 15 cases with meningitis and 2 of 12 cases without meningitis.

Eyster, in 1898⁷⁾, had two cases of cerebro-spinal meningitis due to the Meningococcus. The description of the organisms found in the nose does not exclude Micrococcus catarrhalis. On blood serum agar, colonies „of micrococci developed which appeared in Diplococcus form of two paired hemispheres, separated by an unstained interval, and

1) Scherer, Zur Diagnose der epidemischen Cerebrospinalmeningitis. (Centralblatt f. Bakt. u. s. w. Bd. XVII. 1895. No. 13—14.)

2) Huber, Meningococcus intracellularis im Spinalleiter und Nasensekret eines Falles von epidemischer Genickstarre. (Dtsche med. Woch. Bd. XXIII. Ver.-Beil. 1897. No. 12. p. 79.)

3) Heubner, Ueber den Meningococcus. (Dtsche med. Woch. Ver.-Beil. 3. Juni. 1897. No. 16. p. 109.)

4) Schiff, Ueber das Vorkommen des Meningococcus intracellularis (Weichselbaum) in der Nasenhöhle nicht meningitiskranker Individuen. (Centralblatt f. innere Med. Bd. XIX. 1898. p. 577.)

5) Antony et Ferré, Recherches bactériologiques dans la meningite cérébro-spinale. (Archives de médecine et de pharmacie militaire. Juin 1898. p. 431.)

6) Councilman, Malory and Wright, loc. cit.

7) Eyster, Cerebro-spinal meningitis. (J. Am. Med. Ass. Vol. XXXIII. 1899. p. 187—188.)

were readily decolorized by Gram's method of staining and were undoubtedly the *Diplococcus intracellularis meningitidis* of Weichselbaum“.

Conclusions.

1) Organisms, present in the nose and resembling the *Diplococcus intracellularis meningitidis* of Weichselbaum in morphology and staining reaction, can not be accepted as meningococci unless the diagnosis is confirmed by cultures and the differentiation of the colonies from those of other closely related diplococci.

2) The *Meningococcus* has been thus proved to exist in the nasal secretion of one patient with and three patients without meningitis.

3) Forty-nine other cases, recorded in the literature as nasal infection with meningococci, are not thus substantiated.

Nachdruck verboten.

Der Schildkrötentuberkelbacillus, seine Züchtung, Biologie und Pathogenität.

[Aus dem anatom.-biologischen Institut der Universität Berlin (Direktor : Herr Geh. Rat Prof. Dr. Hertwig).]

Von Dr. Friedrich Franz Friedmann, Berlin.

Mit 1 Tafel.

Nachdem ich in Bd. IV. Heft 5 der Zeitschrift für Tuberkulose und Heilstättenwesen eine genaue Beschreibung meiner beiden Ausgangsfälle von spontaner Schildkrötentuberkulose gegeben habe, will ich im Folgenden über einige Eigenschaften des aus der Schildkrötenlunge reingezüchteten Tuberkelbacillus berichten.

I. Die Methode der Kultivierung.

Es wurde eine Anzahl der in beiden Lungen reichlich vorhandenen käsigen Knötchen mit sterilen Instrumenten herauspräpariert und in der üblichen Weise vorsichtig zwischen geglähte und wieder erkaltete Glasplatten gebracht, sodann zu einer gleichmäßigen Masse gequetscht. Hierauf wurden Partikelchen dieser käsigen Massen, die bei mikroskopischer Kontrollierung enorme Mengen von Tuberkelbacillen zeigten, mit einer zu einem Spatelchen breit geklopften Platinnadel auf Nährböden ausgestrichen und in dieselben festgedrückt. Verwandt wurde zunächst Glycerinagar, Glycerinblutserum, Glycerinbouillon und Glycerin-gelatine¹⁾.

Schon von diesen ersten mit dem Ausgangsmaterial besäten Röhren ist eine gewisse Zahl von Anfang an rein geblieben und lieferte mir unmittelbar Reinkulturen der Schildkrötentuberkelbacillen. Ich besitze noch jetzt eine Reihe solcher gänzlich unberührt gelassener Kulturen erster Generation, die noch die ursprünglich

1) Ueber das Verhalten des Schildkrötentuberkelbacillus auf pflanzlichen, sowie auf den von Proskauer und Beck eingehend studierten anorganischen Tuberkelbacillennährböden wird in einer späteren Arbeit berichtet werden.

aufgebrachten Lungenstückchen enthalten und sehr üppig gewachsen sind.

Es ist dieses selten günstige Züchtungsergebnis einerseits dem Umstande zuzuschreiben, daß in den käsigen Lungenknötchen die Tuberkelbacillen in großen Mengen und nicht durch anderweitige Bakterien verunreinigt vorhanden waren, andererseits aber auch nur dadurch ermöglicht, daß bei der Herstellung der Kulturen aus der tuberkulösen Lunge aufs peinlichste alle die Vorschriften befolgt wurden, die R. Koch für diesen Zweck in seinem für alle Zeiten der Tuberkuloseforschung vorbildlichen Meisterwerke „Die Aetiologie der Tuberkulose“ gibt.

II. Entwicklung und Aussehen der Kulturen. Wachstumstemperaturen.

Ein Teil der geimpften Röhrchen wurde in einen auf 22° C gehaltenen Thermostaten, andere bei 37° C eingestellt. Auf mehreren der bei 22° gehaltenen Kulturen war schon nach 4—5 Tagen stellenweise jener charakteristische leicht bläuliche, hauchartige Schleier zu erkennen, der auch bei der Kultivierung der menschlichen Tuberkelbacillen den Beginn der Reinkultur anzeigt. Am ersten war dieses beginnende Wachstum in der unmittelbaren Umgebung der mitübertragenen Lungenstückchen wahrzunehmen. Offenbar fördern diese Partikelchen des gewohnten tierischen Nährmaterials die Tuberkelbacillen in der zunächst noch ungewohnten Entwicklung auf dem künstlichen Nährboden. Dieser bläuliche Schleier erwies sich mikroskopisch als rein aus Tuberkelbacillen bestehend. Nach weiteren 2—3 Tagen wurden dann auch hier und da distinkte, punktförmige, von Anfang an ziemlich trockene Kolonien sichtbar, die eine weiße Farbe (mit einem ganz leisen Stich ins bläuliche) zeigten und dem Nährboden sehr fest anhafteten. 10 Tage nach der Aussaat waren diese Kolonien bereits vergrößert und auch zahlreicher sichtbar geworden, und nach 3 Wochen ein großer Teil der Nährbodenoberfläche von einem dichten Bacillenrasen überzogen.

Auf Glyceringelatine bildet die Kultur der Schildkröten-tuberkelbacillen (Fig. 1) einen zusammenhängenden, höckerig körnigen Ueberzug, größere und kleinere prominierende Knötchen. Macht man von einer solchen Reinkultur eine Strichimpfung auf ein frisches Gelatineröhrchen, so erhält man schon nach 8 Tagen strahlige Bänder, die mit konfluierenden Körnchen dicht besetzt sind und einen ebenfalls aus solchen Körnchen bestehenden Zentralfaden (den Impfstrich) zeigen (Fig. 1). Anfangs wuchsen noch in einigen Röhrchen außer den Kolonien des Schildkrötentuberkelbacillus schleimigfeuchte, tröpfchenartige Kolonien, die aus fremden Keimen (meist war es eine kleine Kokkenform) bestanden; doch auch diese enthielten zwischen sich reichlich Tuberkelbacillen einzeln und in Nestern, so daß auch aus diesen verunreinigten Bakterienkolonien durch Abstich und Strichimpfung auf in Petri-Schälchen ausgegossenen Glycerinagar resp. Glyceringelatine unschwer die Schildkrötentuberkelbacillen isoliert werden konnten.

Die Gelatine wird durch den Schildkrötentuberkelbacillus nicht verflüssigt.

Aehnlich, aber nicht genau wie die Glyceringelatinekulturen sehen die bei gleicher Temperatur entwickelten Glycerinagarkulturen der Schildkrötentuberkulose aus. Diese zeigen, namentlich anfangs, ein etwas feuchteres Aussehen; auch erscheint die Oberfläche des

Bacillenrasens nicht so kleinhöckerig, körnig, sondern hat mehr das Aussehen von größeren und kleineren, runden, gelbweißen Perlen. Oefter bilden sich auch mehr längliche, wurstförmige Stränge. Von der zweiten Woche an tritt auf beiden Nährböden sehr schnelles üppiges Wachstum ein.

Auch auf einigen Glycerinserumröhrchen wurden Reinkulturen erhalten, allerdings schien hier das Wachstum etwas langsamer und trat merklich erst nach 10—12 Tagen ein.

Die bei 37° angelegten Kulturen zeigten den Wachstumsbeginn im Vergleich mit den bei 22° gehaltenen Gelatine- und Agarkulturen etwas verspätet und verlangsamt, nämlich erst nach 8—10 Tagen. Die 37°-Kulturen der Schildkrötentuberkelbacillen bekamen nun ein von den bei niedriger Temperatur gewachsenen recht abweichendes Aussehen. Auch hier waren die allerersten Wachstumsanfänge nach 6—8 Tagen als leichte Schleier bemerkbar, doch bildeten sich nicht distinkte, punktförmige Kolonien, sondern es entstand ein feinkörniges, graugelbes Häutchen, das als ein anfangs noch leicht abhebbarer, später fester und fester haftender Belag die Nährbodenoberfläche überzog. 12—14 Tage nach der Aussaat ist auch an den 37°-Kulturen eine bedeutende Wachstumsvermehrung zu konstatieren: der Bakterienrasen haftet jetzt dem Nährboden fest an und hat eine harte Konsistenz und ein bröckeliges, schilferiges Aussehen bekommen. Es erheben sich auf dem unteren — inzwischen verdickten — Häutchen kleine, dichtgestellte Querrunzeln und Fältchen. Schon diese Kulturen erster Generation der bei 37° gewachsenen Schildkrötentuberkelbacillen sehen den Kulturen der menschlichen Tuberkulose außerordentlich ähnlich. Von einer solchen, einige Wochen bei 37° gewachsenen Kultur wurden eine Reihe von Uebertragungen auf Glycerinagar vorgenommen und wiederum bei 37° eingestellt, wobei absichtlich nur kleine Partikelchen überbracht wurden. Auch jetzt tritt ein sehr üppiges Wachstum ein und die Kulturen sind von denen menschlicher Tuberkelbacillen nun nicht mehr unterscheidbar; sie wurden Herren, die anerkannte Spezialkenner auf diesem Gebiete sind, gleichzeitig mit Kulturen menschlicher Abkunft vorgelegt und für ununterscheidbar erklärt (vergl. Fig. 3 [menschliche Tuberkulose] und Fig. 2 [Schildkrötenkulose])¹⁾. Die dritte Generation der bei 37° entwickelten Schildkrötentuberkelbacillenkulturen vollends wächst wieder bedeutend langsamer als die zweite: es treten einzelne trockene, sich ganz allmählich vergrößernde weiße körnige Knoten auf, die trockenen Brotkrumen ähnlich sehen und regelmäßig konfluieren, so daß kleinere und größere Auswüchse und Höcker entstehen und schließlich die Bacillenmasse ein gebirgsartiges Aussehen gewinnt. Wenn man von solchen durch mehrere Generationen bei 37° entwickelten Glycerinagarkulturen Ueberimpfungen auf Gelatine vornimmt und bei 22° wachsen läßt, so halten die so erzielten Kulturen in ihrem Aussehen etwa die Mitte zwischen den Charakteren der 37°-Kulturen und der 22°-Kulturen.

Schon durch die Tatsache des guten Fortkommens bei 37° — der Körpertemperatur des Menschen — sowie durch

1) Diese beiden Zeichnungen, die das Aussehen der beiden Kulturen treffend wiedergeben, wurden, um volle Objektivität zu wahren, von einem sehr geübten, aber nicht medizinisch gebildeten Maler angefertigt.

das höchst charakteristische Aussehen der Kulturen, wie es von allen bisher bekannten Bacillen aus der Gruppe des Tuberkelbacillus nur dem Bacillus der menschlichen Tuberkulose und dem Perlsuchtbacillus zukommt, unterscheidet sich der Bacillus der Schildkrötentuberkulose erheblich insbesondere von sämtlichen bisher aus dem Kaltblüterkörper gezüchteten Tuberkelbacillen: dem Fischtuberkelbacillus (Bataillon, Dubard, Terre)¹⁾, dem durch Blindschleichenpassage modifizierten Tuberkelbacillus (Moeller)¹⁾, dem durch Froschpassage modifizierten Tuberkelbacillus (Bataillon¹⁾-Lubarsch-Dieudonné).

Nun sind aber die Temperaturen 22° und 37° keineswegs die äußersten Wachstumsgrenzen des von mir gezüchteten Schildkrötentuberkelbacillus.

Zunächst ergab sich, daß derselbe, sobald die Kulturen vor Licht geschützt aufbewahrt werden, auch bei gewöhnlicher Zimmertemperatur (13—14° C) recht gut gedeiht: freilich ist in der ersten Zeit das Wachstum ein etwas langsames; nach 4 Wochen ist jedoch auch bei dieser Temperatur der größte Teil der Nährbodenoberfläche mit dem Bacillenrasen bedeckt.

Sodann wurde nachgewiesen, daß der Schildkrötentuberkelbacillus selbst bei Eistemperatur (im Eisschrank) zu wachsen im stande ist; hier ist das Wachstum nun allerdings ganz bedeutend verzögert: in den ersten 3—4 Wochen ist eine Vermehrung der aufgebrauchten Reinkulturpartikelchen nicht wahrnehmbar, dann beginnt ganz langsam neues Wachstum, welches nach 5—6 Wochen etwa die Hälfte der Nährbodenoberfläche in Form eines feinen, nicht annähernd so üppig wie bei höheren Temperaturen entwickelten Ueberzuges bedeckt. Sowohl auf Glyceringelatine wie namentlich auf Glycerinagar zeigen die Eiskulturen ein etwas feuchtes Aussehen, die Glycerinagarkulturen sehen dann bisweilen geradezu schleimig aus, ähnlich denen der Hühnertuberkulose. Um die obere Temperaturgrenze, sowie die Größe des Anpassungsvermögens des Schildkrötentuberkelbacillus festzustellen, wurden sowohl Uebertragungen der Eiskulturen als der bei 22° und bei 37° gewachsenen für mehrere Wochen in einen auf 43° (das Temperaturoptimum der Hühnertuberkelbacillen) eingestellten Thermostaten gebracht. Hierbei ergab sich, daß die von den Eiskulturen übertragenen Partikelchen, wie infolge des kolossalen plötzlichen Temperaturabstandes verständlich, keine Spur von Wachstum, sondern vielmehr eine allmähliche Verringerung zeigten; eine eigentliche Eintrocknung erfolgte jedoch nicht. Die von den 22°-Kulturen stammenden Partikelchen zeigten bei mehrwöchentlicher Einwirkung einer Temperatur von 43° keinerlei quantitative Veränderung, weder Vermehrung noch Verminderung. Dagegen wiesen die von den 37°-Kulturen aufgetragenen Bacillenpartikelchen, die also den geringsten Temperaturunterschied zu überwinden hatten, nach mehrwöchentlichem Aufenthalte in einem 43°-Thermostaten eine wenn auch geringe, so doch zweifellose Vermehrung auf.

Die morphologischen Veränderungen der so behandelten Kulturen werden im nächsten Kapitel beschrieben werden.

1) Die Herren Direktor Dr. Moeller-Belzig und Prof. Bataillon-Dijon hatten die Güte, mir von ihnen gezüchtete Kulturen aus der Blindschleiche bezw. aus dem Karpfen und Frosch zu übersenden. Ueber die mit diesen Kulturen angestellten vergleichenden Versuche wird in einer späteren Arbeit berichtet werden.

Endlich wurden noch Glycerinagarröhrchen mit Kulturpartikelchen, die bei 37° gewachsen waren, in einen Thermostaten von 58° gestellt: indessen vertrocknete bei dieser Temperatur das übertragene Bacillenmaterial vollständig und ging innerhalb einer Woche zu Grunde.

Jedenfalls geht aus diesen Erfahrungen hervor, daß der Bacillus der Schildkrötentuberkulose innerhalb außerordentlich weiter Temperaturuntergrenzen, 0° bis 43°, zu wachsen im stande ist und sogar sehr erhebliche plötzliche Temperaturunterschiede überwindet. Wahrscheinlich dürfte es gelingen, ihn durch allmähliche Steigerung an noch höhere Temperaturen als 43° zu gewöhnen.

Der Schildkrötentuberkelbacillus wächst auch sehr gut auf Glycerinbouillon. Er bildet hier Oberflächenhäutchen genau wie der menschliche Tuberkelbacillus. Bringt man einen kleinen Bröckel des Bacillenasens von einem festen Nährboden vorsichtig auf ein mit Glycerinbouillon versehenes Erlenmeyersches Kölbchen, so daß wenigstens ein Teilchen an der Oberfläche zu schwimmen kommt, so bildet sich schon nach wenigen Tagen zunächst ein feiner, grauer Schleier, der sich allenthalben von dem aufgetragenen Bröckelchen ausbreitet, später mehr gelblich wird und schließlich die ganze Oberfläche der Bouillon als runzlige Haut überzieht und sich am Glase festsetzt. Die Bouillon bleibt vollkommen klar; wenn das Wachstum immer weiter zunimmt, so sinken schließlich die Bacillenmassen zu Boden.

Auch zur unmittelbaren Gewinnung von Reinkulturen aus dem Schildkrötenkörper erwies sich die Glycerinbouillon als geeignet: einige mit fein zerschnittenen käsigen Lungenknötchen versehenen Bouillonröhrchen, die, anfangs öfter umgeschüttelt, bei 22° gehalten wurden, zeigten nach einigen Wochen graugelbe Oberflächenhäutchen und einen feinkörnigen Bodensatz, die sich beide ausschließlich aus den Schildkrötentuberkelbacillen bestehend erwiesen, Gewebszellen wurden überhaupt nicht mehr gefunden, dieselben sind offenbar vollkommen aufgelöst. Die Bouillon war vollständig klar geblieben. Ebenso bleibt auch in den festen Nährböden, wenn durch direkte Impfung in das Kondensationswasser oder durch Senken des Röhrchens Bacillenmassen in das Kondensationswasser gelangen, dieses letztere stets klar. Es sei mir gestattet, hier die Worte Robert Kochs selbst zu zitieren, die die gleichen Verhältnisse bei den menschlichen Tuberkulosekulturen beschreiben und erläutern und die genau für die Schildkrötentuberkelbacillen passen: „Die von ihnen (den Tuberkelbacillen) gebildeten dünnen Membranen lösen sich in der Flüssigkeit (dem Kondensationswasser) nicht auf, sondern zerbrechen infolge ihrer festen Konsistenz in mehr oder weniger große Schollen, welche von der Flüssigkeit fortgespült werden und sich schließlich am Boden ablagern. Die eigentümliche starre und brüchige Beschaffenheit dieser Kolonien zeigt sich am besten in dem Teil der Kultur, welcher die im Reagenzglas befindliche Flüssigkeit überzieht. Sobald diese Flüssigkeit in Bewegung gesetzt wird, zerbricht das Häutchen an ihrer Oberfläche in Platten und Schollen, welche langsam zu Boden sinken. Die Flüssigkeit bleibt stets klar, sowohl wenn die Bacillenvegetation selbst darüber hinwegzieht, als auch wenn durch Abspülen der Serumoberfläche Bacillenmassen hineingelangen oder wenn von vornherein Impfsubstanz absichtlich hineingebracht wurde.“

In dieser Erscheinung sieht R. Koch unter anderem eine Be-

stätigung der von ihm auch durch direkte Beobachtung gefundenen Tatsache, „daß die Tuberkelbacillen keine selbständige Bewegung besitzen, denn bewegliche Bakterien verteilen sich in den Nährlösungen nach allen Richtungen hin und geben denselben dadurch ein trübes Aussehen.“

Bringt man ein kleines Bröckelchen einer Reinkultur der Schildkrötentuberkelbacillen mit der Platinöse an die Flamme des Bunsenbrenners, so verbrennt das Kulturpartikelchen stets unter Erzeugung eines eigentümlichen Knisterns und Knatterns, welches für alle bisher gezüchteten Bacillen aus der Gruppe des Tuberkelbacillus charakteristisch (sonst übrigens meines Wissens nur der Gruppe des *Actinomyces* zukommt) und ein so untrügliches Merkmal ist, daß, wenn man bestimmte Teile oder zweifelhafte Kolonien in verunreinigten Röhrchen auf ihren Gehalt an irgendwelchen säurefesten Bacillen prüfen will, man oft nur diese Probe anzustellen braucht: verbrennt das Bakterienmaterial ohne jedes knisternde Geräusch, so sind an der betreffenden Stelle des Nährbodens größere Mengen säurefester Bacillen sicher nicht vorhanden.

III. Morphologisches Verhalten der reingezüchteten Schildkrötentuberkelbacillen¹⁾.

Sowohl für die ausgestrichenen Kulturtrockenpräparate als für die nach Tausenden zählenden Schnitte aus den unten folgenden Tierversuchsreihen wurde auch hier wieder zur Tuberkelbacillenfärbung ausschließlich das jedesmal frisch bereitete Ehrlichsche Anilinwasserfuchsin verwandt und auch im übrigen nach der Methode verfahren, die in dem Artikel „Tuberkelbacillen“ in der von Ehrlich, Weigert, R. Krause etc. herausgegebenen Encyclopädie der mikroskopischen Technik von mir beschrieben ist.

Die Schildkrötentuberkelbacillen zeigen mikroskopisch in ihren Reinkulturen dieselben Formen und Eigenschaften, die schon in der tuberkulösen Schildkrötenlunge selbst beobachtet und in der Zeitschrift für Tuberkulose, Bd. IV. Heft 5 beschrieben und abgebildet wurden.

Das hervorstechendste Merkmal ist die in entwickelten Kulturen stets vorhandene vollständige Alkohol- und Säurefestigkeit aller Bacillenindividuen. Nur in ganz jungen Reinkulturen (ich beobachtete es in 5- und 7-tägigen primären Glycerinagarkulturen) begegnet man zwischen den in der unendlichen Mehrzahl vorhandenen, dunkelrot gebliebenen, d. h. säurefesten Bacillen auch einigen Stäbchen, die nur blaßrosa gefärbt bleiben, und anderen, die sogar eine schwach blaue Kontrastfärbung (mit Methylenblau) annehmen. Bekanntlich haben bereits Ehrlich und später Klein und Marmorek für die menschlichen Tuberkelbacillen den Nachweis geführt, daß dieselben in ihren ersten Jugendformen durch Säuren noch leicht entfärbt werden können. Die Länge der einzelnen Bacillen schwankt in den verschiedenen Kulturen und in ein und derselben Kultur nicht unerheblich, etwa zwischen 1,6 und 4,5 μ , gerade wie in der tuberkulösen Schildkrötenlunge selbst

1) Durch das lebenswürdige Entgegenkommen der Firma Carl Zeiss-Jena war es mir möglich, Präparate der Schildkrötentuberkelbacillen in dem mit der neuen Siedentopfschen Dunkelfeldbeleuchtung versehenen Mikroskop (Apochrom. Imm. Objekt. 2 mm, Kompens. Okul. 18, Vergrößerung 2250mal) zu betrachten. Durch diese optische Anordnung, welche eine wesentlich höhere Definition als bei Anwendung diffusen Lichtes gibt, werden gewisse, bisher nicht gesehene Feinheiten der Bakterienstruktur sichtbar.

und wie es für die meisten Repräsentanten der Gruppe des Tuberkelbacillus, insbesondere für den Kochschen Bacillus selbst, seit langem bekannt ist. Immerhin ließ sich als Regel feststellen, daß die auf Glyceringelatine gewachsenen Schildkrötentuberkelbacillen durchschnittlich um $\frac{1}{2}$ —1 μ kürzer waren als die von den entsprechenden (22°) Glycerinagarkulturen stammenden und daß die 37°-Kulturen wiederum um fast 1 μ längere Bacillenindividuen aufwiesen als die bei niedriger Temperatur entwickelten (vergl. Fig. 5 u. 6: 37° resp. 22°-Kulturen der Schildkrötentuberkulose).

Was die Form der künstlich gezüchteten Schildkrötentuberkelbacillen anbelangt, so sieht man gerade verlaufende, kommaförmig gebogene, geschwungene oder geknickte Stäbchen, wie sie in jeder vom Menschen stammenden Reinkultur und auch fast in jedem tuberkulösen Sputum nebeneinander zu finden sind. Gerade die bei 37° zu etwas längeren Formen als bei niedriger Temperatur ausgewachsenen Bacillen der Schildkrötentuberkulose sind auch in ihren mikroskopischen Kulturpräparaten völlig ununterscheidbar von denjenigen entsprechender menschlicher Kulturen (vergl. Fig. 4 u. 5: 37°-Kulturen der menschlichen resp. Schildkrötentuberkulose). Um völlig gleiche Verhältnisse zu schaffen, wurden von gleichalterigen Kulturen der menschlichen Tuberkulose einerseits und der Schildkrötentuberkulose andererseits kleine Mengen mit der Platinnadel auf ein und denselben Objektträger dicht nebeneinander ausgestrichen, also gleichzeitig gefärbt, entfärbt u. s. w. — es war völlig ausgeschlossen, auch nur den geringsten Unterschied herauszufinden, was Färbung, Form, Länge, Dicke anbetraf.

Wenn es auch, wie A. Kayserling mit Recht hervorhebt, oft nicht möglich ist, in Reinkulturen von verschiedenen Tuberkelbacillenarten (menschliche, Rinder-, Vogel-, Fisch-, Blindschleimentuberkelbacillen) im Aussehen der Bakterienindividuen morphologische Differenzen zu konstatieren, fand ich doch die von Moeller aus der künstlich infizierten Blindschleiche, die von Bataillon aus dem künstlich infizierten Frosch gezüchteten Tuberkelbacillen, sowie die Bataillon-Dubard-Terreschen Fischtuberkelbacillen in vielen von Reinkulturen angefertigten Präparaten ganz bedeutend kürzer und meistens dicker als die menschlichen resp. Perlsucht-, sowie die Schildkrötentuberkelbacillen (selbst als die bei niederen Temperaturen gewachsenen).

Außerdem berichten Lubarsch und Bataillon übereinstimmend, in 9—10-tägigen Agar- und Serumkulturen der Fischtuberkelbacillen (die nach der neuen Bataillon-Moeller-Terreschen Publikation identisch mit den Moellerschen Blindschleimentuberkelbacillen sind) reichlich verzweigte Formen, sowie Körnerbildungen und endständige Anschwellungen gefunden zu haben¹⁾. Dagegen sieht man in selbst viel älteren Kulturen der Schildkrötentuberkelbacillen derartige Formen nicht. Vielmehr wurden in Reinkulturen innerhalb der ersten 5—6 Wochen auf allen Nährböden nur gleichmäßig homogen gefärbte, nicht gekörnte, unverzweigte Bacillenformen beobachtet, und zwar sowohl in Kulturen von Eistemperatur, Zimmertemperatur, 22°, als auch in solchen, die bei 37° gewachsen waren.

Erst wenn die Kulturen älter werden (nach 6—8 Wochen), treten die bekannten und bei allen Tuberkelbacillenarten beob-

1) A. Kayserling erwähnt lange und verzweigte Formen nur in alten Bouillonkulturen der Fisch- und Blindschleimentuberkulose.

achteten Involutionsformen auf: Stäbchen, die mit dunkelroten bis schwarzroten, endständigen, mittelständigen oder auch perlschnurartig aufgereihten Körnchen oder Kügelchen besetzt sind. Noch später treten verzweigte und zu langen Körnchenfäden ausgewachsene Formen auf. Bringt man aber in solchem Zustande befindliches Kulturmaterial auf frischen Nährboden, so findet man nach einigen Tagen wieder ausschließlich homogen gefärbte, vollsaftige Stäbchen. .

Dagegen bilden die Schildkrötentuberkelbacillen in verunreinigten Kulturen — insbesondere in Gelatinekulturen, die durch fremde, die Gelatine verflüssigende Keime verdorben sind — schon nach wenigen Tagen gekörnte, verzweigte Formen und lange Fäden. Sie werden dann in der verflüssigten Gelatine schnell überwuchert und bald vollständig vernichtet, so daß in derselben nach einigen Wochen säurefeste Formen nicht mehr zu finden sind.

Genau dieselben Involutionsformen der Schildkrötentuberkelbacillen, die in künstlichen Kulturen bei Erschöpfung des Nährbodens auftreten, wurden auch in den beiden tuberkulösen Schildkrötungen selbst in absterbenden (in Verkäsung begriffenen) Gewebsbezirken stets und nur da beobachtet: offenbar sind diese Formen stets ein Ausdruck dafür, daß das jeweilige Nährsubstrat der Bacillen ein unzureichendes ist oder die sonstigen Existenzbedingungen schlechte sind.

Da als solche schlechten Existenzbedingungen natürlich auch plötzliche große Temperaturdifferenzen zu betrachten sind, so ist folgendes ohne weiteres verständlich: es wurden, wie im vorigen Kapitel beschrieben, von den Eiskulturen, den bei 22°, sowie den bei 37° gewachsenen Kulturen Partikelchen auf neue Nährböden übertragen und diese sofort für 3 Wochen bei 43° eingestellt; dabei ergab sich, daß in dem von der 37°-Kultur stammenden Röhrchen noch einige homogene Stäbchen, in der Mehrzahl aber bereits rosenkranzförmige und verzweigte Formen vorhanden waren; in dem von der 22°-Kultur stammenden Röhrchen (Temperaturunterschied 21°!) fanden sich homogen färbare Bacillen überhaupt nicht mehr, dagegen noch vereinzelte unverzweigte Rosenkranzformen, hauptsächlich aber verzweigte Körnchenfäden, die eine hellrosa Grundsubstanz und in ihr in Abständen gelagerte dunkelrote Körnchen enthielten; in dem von der Eiskultur stammenden Röhrchen (Temperaturunterschied ca. 43°!) waren keinerlei einzelne Formen mehr erkennbar, sondern das Präparat bestand ausschließlich aus einem säurefesten dichten Netzgewir von blaßrosa gefärbten, vielfach verzweigten und verschlungenen Fäden und in den Knotenpunkten und Maschen des Netzwerkes unregelmäßig liegende dunkelrote Körnchen und Kügelchen.

Wenn die von Lubarsch aufgestellte Regel, daß die erwähnten Involutionsformen bei den verschiedenen Tuberkelbacillenarten um so frühzeitiger auftreten, „je mehr sich die Pilze einem mehr saprophytischen Dasein anpassen“, zu Recht besteht, so wäre auch in dem späten Auftreten dieser Formen beim Schildkrötentuberkelbacillus ein Grund gelegen, in diesem trotz seiner weiten Wachstumstemperaturgrenzen keinen Saprophyten zu erblicken.

IV. Tierversuche

wurden sowohl mit den aus der tuberkulösen Schildkrötenlunge entnommenen möglichst fein zerquetschten und in steriler Bouillon aufgeschwemmten käsigen Knötchen (in den Versuchsprotokollen kurz

„Lungenknötchen“ bezeichnet) als auch später mit den frisch gewonnenen Reinkulturen der Schildkrötentuberkelbacillen vorgenommen. Dabei war der pathogene Effekt derselbe, gleichviel ob die bacillenhaltigen Knötchen oder die reingezüchteten Bacillen selbst verimpft wurden. Auf eine genaue Gewichtsdosierung der zur Infektion benutzten Kulturmengen konnte in diesen ersten Versuchsreihen, die zunächst einen Ueberblick der Wirkungsweise der Schildkrötentuberkelbacillen („Schkr.T.B.“ oder kurz „T.B.“ bezeichnet) auf die verschiedenen Tierspecies geben sollten, verzichtet werden. Bei der Reinkulturimpfung („R.K.“ bezeichnet) wurde gewöhnlich eine üppig gewachsene Kultur zur Infektion für 10—12 Tiere verwandt, so, daß zunächst die mit dem Platinspatel abhebbaren oberflächlichen Bakterienmassen in sterile Kochsalzlösung resp. Bouillon gebracht, sodann der Rest der Kultur mit wiederholt aufgegossener und umgeschüttelter Flüssigkeit aufgenommen wurde — durchschnittlich wurden für eine Reinkultur 10—12 ccm Flüssigkeit verwandt — und durch sorgfältiges Zerreiben eine möglichst gleichmäßige Emulsion hergestellt wurde: von dieser erhielten die meisten Versuchstiere je 1 ccm. Ein Tröpfchen solcher Injektionsflüssigkeit enthielt nicht gerade besonders zahlreiche, aber immerhin genügende — in jedem Immersions Gesichtsfeld 5—10 — Bacillen. Bei Infektionen in Hauttaschen wurden natürlich zerkleinerte Lungenknötchen resp. eine Platinöse der Reinkultur als solche (ohne Flüssigkeit) verwandt.

Es muß schon hier bemerkt werden, daß über die Wirkungsweise der Schildkrötentuberkelbacillen auf Säugetiere, insbesondere auf Meeresschweinchen und Kaninchen, hier nicht erschöpfend berichtet werden kann, da diese Tiere zum großen Teil zur Zeit noch leben und vorläufig nicht getötet werden sollen, andere zu bestimmten weiteren Versuchen verwandt wurden, die jetzt ebenfalls im Institut des Herrn Geheimrat Hertwig fortgeführt werden.

A. Kaltblüter.

a) 7 Schildkröten: *Emys europae* (kleine Sumpfschildkröte) und *Testudo graeca* (große Landschildkröte).

1) *Emys* 3. Jan. 1903. Lungenknötchen in die rechte Lunge injiziert.

Tot 23. Febr. Beide Lungen bis auf einzelne kleine noch lufthaltige Abschnitte vollständig infiltriert, auf der Oberfläche zahllose käsige Knötchen, die enorme Tuberkelbacillenmassen enthalten, ebenso Leber von zahllosen weißen Pünktchen und Knötchen durchsetzt, Milz, die stark geschwollen, ebenfalls mit zahlreichen Knötchen. Mikroskopisch: Lungen-schnitte, die das ganze Organ der Länge nach getroffen haben, zeigen in einigen Bezirken ganz normales bacillenfreies Gewebe und plötzlich, mit scharfer Grenze einsetzend, tuberkulös erkranktes Gewebe: größere bronchopneumonische Herde, in denen alle Alveolen mit Tuberkelbacillenhäufen und dazwischen liegenden Leukocyten ausgegossen sind. Kleinere und größere Blutgefäße im perialveolären und peribronchialen Gewebe enthalten große Bacillenhäufen; in einer sehr großen Arterie, offenbar dem Hauptast der Lungenarterie oder dieser selber, findet sich, nach Art eines wandständigen Thrombus, eine riesengroße ballenförmige Tuberkelbacillenauflagerung. In einem diffus tuberkulösen Granulationsgewebe sind stellenweise die Rundzellen dicht mit Bacillen vollgestopft, auch finden sich hier und da Andeutungen von Caput medusae-Formen (vergl. meine zitierte Arbeit in der Zeitschr. f. Tuberkul.) und kleinen säurefesten Keulen, andere Abschnitte dieses Gewebes sind ziemlich bacillenarm. Schnitte durch Hauptbronchus und Trachea zeigen im Lumen dieser Organe massenhafte, fast ausschließlich in Rundzellen gelegene Tuberkelbacillen. — Leber ganz und gar derartig mit Tuberkelbacillen überschwemmt, daß fast in jedem Gesichtsfelde, selbst bei starker Vergrößerung, größere Bacillenhäufen liegen; vor allem in der nächsten Umgebung von Pigmentanhäufungen stets massenhafte Bacillen; oft sind dieselben zu langen Fäden ausgewachsen; bis-

weilen liegen in großen Haufen säurefester Bacillen einige blaugefärbte Individuen. Zahlreiche zellarme verkäsende Knötchen, die enorme Bacillenmassen enthalten. Auch in größeren Pfortaderästen wurden zahlreiche Bacillen gesehen. Milz ebenfalls von verkäsenden, kaum noch kernhaltigen Knötchen durchsetzt, die Tuberkelbacillen in großer Menge enthalten; zwischen den Knötchen unverändertes, gut färbbares, bacillenfrees Milzgewebe. Im wesentlichen ist das retikuläre Gewebe der bacillären Invasion und Verkäsung anheimgefallen, während die Follikel größtenteils intakt geblieben sind.

2) *Emys*. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen rechter Lunge injiziert, getötet 3. April. Lungen, Leber und Milz von käsigen Knötchen durchsetzt. Aus der Lunge dieses Tieres werden wieder Reinkulturen gezüchtet.

3) *Testudo*. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr.T.B. r. Lunge.

17. Febr. moribund getötet. Im Schleim, der aus dem Maul fließt, außer zahlreichen anderen Bakterien auch Schkr.T.B. Lungen größtenteils infiltriert, stellenweise Verkäsungen, Leber ockergelb, hochgradig atrophisch. Mikroskopisch: Lungen mit derartigen Massen von Schkr.T.B. überschwemmt, daß die Schnittpräparate ganz rot aussehen. Alveolen von Bacillenschwärmen ausgegossen. Vor allem aber sind die größeren Blutgefäße, die auch im Lumen zahlreiche T.B. enthalten, von dicken Ringen umschlossen, welche aus enormen T.B.-Massen bestehen. Größere kernarme, in Verkäsung begriffene Gewebspartien mit massenhaften T.B. Hier kommen längere körnige Bacillenformen vor, während dieselben im übrigen kurze homogene Stäbchen darstellen. Auch Lymphspalten mit T.B. ausgegossen. Leber ebenfalls voll von enormen Massen T.B. Zahlreiche, in Verkäsung begriffene, nur noch schwach färbbare Knötchen, ebenfalls sehr reich an T.B. Nieren: T.B. hier zu langen körnigen Fäden ausgewachsen, besonders zahlreich im interstitiellen Gewebe. Bisweilen auch Harnkanälchen voller T.B. Hoden: Kerne stellenweise mit leuchtend rotem (säurefesten) Kernkörperchen und Kerngerüst. Keine histologischen Veränderungen, keine T.B. gesehen.

4) *Testudo*. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr.T.B. r. Lunge.

17. Febr. wird genau gleichzeitig mit der vorigen moribund; getötet. In dem aus dem Maul fließenden Schleim gleichfalls T.B. und zahlreiche andere Bakterien. R. Lunge tuberkulös krank, vereinzelte käsige Knötchen, ziemlich gleichmäßig infiltriert. Leber und Milz geschwollen, trübe aussehend, Knötchen enthaltend, Nieren ohne Veränderung. Mikroskopisch: Lungen: Diffuses Granulationsgewebe mit kolossalen T.B.-Massen, inmitten der weitaus überwiegenden Mehrzahl der säurefesten, auch mit der Gegenfarbe (Methylenblau) gefärbte Bacillen und Uebergangsstadien zwischen beiden. Leber mit geradezu unglaublichen T.B.-Massen durchsetzt, so daß die Schnitte fast vollkommen rot bleiben. Milz durchsetzt von unzähligen kernarmen verkäsenden und verkästen Knötchen, die mit T.B. vollgestopft sind. Follikel größtenteils ganz frei von T.B., gut färbbar. Nieren enthalten auch viele T.R.-Haufen, aber nicht so reichlich wie die anderen Organe.

5) *Testudo*. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal.

13. Febr. tot. Das ganze Peritoneum¹⁾ von den Lungenspitzen bis zur Blase mit zahllosen dicht gestellten, bacillenreichen, käsigen Knötchen übersät, auch zahlreiche, im Mesenterium sitzende, wie kleine Drüsen aussehende verkäste Knötchen. Leber trübe verfärbt, mit zahlreichen Knötchen, Milz stark geschwollen, enthält ebenfalls Knötchen. Mikroskopisch: Die Peritonealknötchen bestehen aus Zellen, die von dichten Haufen leuchtend roter T.B. vollgestopft sind. Lungen keine nennenswerten Veränderungen, stellenweise dichte T.B.-Haufen, andere Bezirke bacillenfrie; dagegen Leber ganz und gar von kolossalen T.B.-Massen durchsetzt, die größtenteils periacinöse Herde bilden. Nieren von enormen T.B.-Massen überschwemmt, die größtenteils in den Glomeruli liegen, derart, daß fast in jedem Glomerulus T.B.-Nester vorhanden sind, auch in größeren Blutgefäßen, und zwar sowohl zwischen als in den roten Blutkörperchen viele T.B. Auch zahlreiche T.B. im interstitiellen Gewebe, sowie vereinzelte im Epithel. Stellenweise Caput medusae-Herde von T.B. Hoden: rote Blutkörperchen enthalten zum Teil T.B.

6) *Emys*. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen. Hauttasche (r. Schulter). 5. März moribund getötet. An der Infektionsstelle großer käsiger Herd, die genähte Hautwunde über dieser Stelle gut verheilt. Leber voller Knötchen, auch eine größere fleckige Sprengelung auf der Oberfläche sichtbar, fibrinöse Auflagerungen auf dem Peritonealüberzug, Milz durch derbe peritonitische Adhäsionen fixiert. Linke Lunge lufthaltig, rechte zeigt zahlreiche Knötchen, ist von fester Konsistenz, sinkt im Gefäß sofort zu Boden. Mikroskopisch: Leber enthält Tuberkel,

1) Die Schildkrötenlungen sind ventral und kaudal vom Peritoneum überzogen, dorsal dagegen direkt der Schildplatte angewachsen.

die den im Meerschweinchenkörper (s. unten) durch Schkr.T.B. erzeugbaren sehr ähnlich sehen, nur sind hier im Kaltblüterkörper die Schkr.T.B. in der Regel viel länger und in diesen Knötchen in viel größerer Menge vorhanden als beim Warmblüter. Zahlreiche typische Caput medusae-Formen, auch Andeutung von Strahlenherden. Lunge enthält stellenweise konfluierende zellarme Knötchen mit mäßig zahlreichen Bacillen. Milz: Massen von T.B.-Nestern, Caput medusae-Formen. Niere: Im interstitiellen Gewebe zahllose T.B.-Haufen. Ovarium: T.B. oder histologische Veränderungen nicht gesehen. Herd an der Infektionsstelle: verkäsendes Gewebe, enorme Massen von T.B., keine Strahlenherde.

7) *Emys*. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen. Hauttasche (r. Schulter). 22. März tot. An der Infektionsstelle größerer käsiger Herd, Hautwunde verheilt. Leber und Milz Knötchen. Mikroskopisch: Leber stellenweise Haufen von T.B., zahlreiche Leberzellenkerne mit rotem Kernkörperchen, ebenso Zellen mit roten (säurefesten) Granula. Milz spärliche T.B. In dem verkäsenden Gewebe an der Infektionsstelle Haufen von T.B., zum Teil langer Körnchenfäden, zum Teil homogen gefärbter Bacillen, sowie große homogenisierte säurefeste Schollen, die offenbar durch Einschmelzung von T.B.-Haufen entstanden sind (vergl. meine zitierte Arbeit über die Schildkrötentuberkulose).

b) 2 Ringelnattern.

8) Ringelnatter. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 12. Febr. tot. In der Leber und auf dem ganzen Peritoneum zahllose käsig Knötchen, die massenhafte T.B. enthalten. Lungen großenteils infiltriert, zahlreiche Knötchen. Darmperitoneum vielfach mit dicken, fibrinöses käsiges Auflagerungen bedeckt. Mikroskopisch: Leber von so enormen T.B.-Massen durchsetzt, daß auf Schnitten die Bacillenhaufen viel mehr Raum einnehmen als das Gewebe. Zum Teil erscheinen die T.B. in Form langer Fäden, in einigen Haufen finden sich Individuen, die nicht säurefest, sondern metachromatisch gefärbt sind. Lunge: Auch hier ist die Vermehrung der Schkr.T.B. eine ganz kolossale. Alveolen großenteils von dichten Bacillenschwärmen erfüllt, diffuses tuberkulöses Granulationsgewebe mit Bacillenmassen, die nur das glatte Muskelgewebe verschonen. Ausschließlich säurefeste Formen, meist homogen gefärbte Bacillen, aber stellenweise auch Körnchenfäden und Streptobacillen. Längsschnitte durch den Darm zeigen, daß die Lymphspalten des Peritoneums voll von meist intracellulär liegenden T.B. sind, auch die Blutgefäße des Darmes enthalten in Wand und Lumen zahllose T.B., dagegen wurden in der Mucosa und Submucosa, sowie im Darmlumen keine gesehen. Niere: Im interstitiellen Gewebe hier und da Bacillenhäufchen, in den Glomeruli keine gefunden. Hoden zeigt auf der Oberfläche des Organes sehr zahlreiche T.B., im Innern keine.

Aus der Leber dieser Ringelnatter wurden Reinkulturen gewonnen, die von den aus der Schildkrötenlunge gezüchteten in einigen Punkten differierten, und über die später berichtet werden wird.

9) Ringelnatter. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. Das Tier magert trotz guter Pflege außerordentlich stark und zusehends ab und wird am 20. Febr. in schwer krankem Zustande getötet. Peritoneum und Leber voller gelber käsiger Knötchen, Milz geschwollen, ebenfalls mit zahlreichen Knötchen. Milzsaft enthält massenhafte T.B. Lungen scheinbar intakt. Mikroskopisch: Lungen zeigen keinerlei Veränderung, auch keine T.B.; Leber von T.B.-Haufen durchsetzt, und zwar teils gleichmäßig gefärbte Bacillen, teils Rosenkranzformen, teils auch verzweigte Fäden (aber letztere Formen wie immer nur in verkäsendem Gewebe). — In größeren Bezirken ist das Gewebe der Leberzellenbalken diffus rot geblieben (trotz intensiver Enttärnung des Präparates), während das zwischen denselben befindliche Bindegewebe die blaue Kontrastfarbe angenommen hat. Man hat den Eindruck, als ob die aus den Tuberkelbacillen stammende säurefeste Substanz gerade zu dem Leberparenchym Affinität habe und in demselben zur Auflösung gekommen ist. Für diese Deutung spricht auch die Tatsache, daß, während sich in dem blaugefärbten Bindegewebe T.B. nicht finden, man in den roten Leberzellenbalken stellenweise fast unentwirrbar dichte T.B.-Ansammlungen trifft und deren successive Homogenisierung und Einschmelzung verfolgen kann. Ferner beobachtet man bisweilen mitten in diesem säurefesten Leberzellengewebe T.B.-Haufen, die metachromatisch blau gefärbt sind, also ihre säurefeste Substanz eingebüßt haben, und es liegt die Vermutung nahe, daß diese säurefeste Substanz eben in das umgebende Gewebe diffundiert ist. Jedenfalls ist diese erhebliche Säurefestigkeit des Leberzellengewebes bemerkenswert und findet sich unter normalen Verhältnissen nicht.

c) 6 Blindschleichen.

10) Blindschleiche. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 20. Jan. tot. Auf dem ganzen Peritoneum miliare und submiliare gelbe

käsige Knötchen, die zahlreiche T.B. enthalten. Leber größere oberflächliche gelbe Knoten, ebenso Milz. Lungen infiltriert, käsige Knötchen. Mikroskopisch: In Leber, Milz, Lungen zahlreiche kernarme käsige Knötchen, die T.B. enthalten, Nieren geringe interstitielle Infiltration, T.B. nicht gefunden.

11) Blindschleiche. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 8. Febr. tot. Trübe Schwellung der abdominalen Organe. In Leber, Lunge, Milz histologische Veränderungen oder T.B. nicht gefunden.

12) Blindschleiche. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 20. Febr. getötet. Auf dem Peritoneum und in der Leber ganz vereinzelt Knötchen, zahlreichere in der Milz. Milzsaft enthält reichliche T.B. Lungen scheinbar intakt (makroskopisch). Mikroskopisch: Leber vereinzelt Knötchen mit T.B., zahlreiche Zellkerne mit roten Kernkörperchen. Lunge normal, keine T.B.

13) Blindschleiche. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 26. Febr. getötet. Rechte Lunge zeigt auf der Oberfläche zahlreiche käsige Knötchen, linke nicht. Leber ockergelb, atrophisch, käsige Knötchen. Milz vereinzelt Knötchen. Mikroskopisch: Rechte Lunge zeigt auf ihrem serösen Ueberzug, aber nicht im Innern des Organes, zahlreiche helle, kaum noch färbare verkäsende Knötchen, welche sehr zahlreiche, großenteils auch strahlenförmig gelagerte (Caput medusae) T.B. enthalten, meist körnige Bacillen. In Milz und Leber spärliche T.B. in den Knötchen. Niere: Zahlreiche Kerne des interstitiellen Gewebes mit säurefesten Kernkörperchen, T.B. nicht gefunden. Ovarium: Granulationsgewebe mit sehr zahlreichen T.B., dagegen in den Eiern keine gefunden.

14) Blindschleiche. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal. (Bei der Injektion wurde ein größeres Bauchgefäß verletzt.)

26. Jan. tot. In der Peritonealhöhle kleines Blutgerinnsel, Knötchen noch nirgends zu sehen. Abdominalorgane stark injiziert (gerötet). Mikroskopisch: Leber ganz durchsetzt von kleinen T.B.-Häufchen, die sich vorzugsweise innerhalb und in nächster Nähe der Pigmentzellen finden. Außer geringer interstitieller Zellwucherung keine histologische Veränderung. Peritoneum dicht erfüllt von Leukocyten, die mit T.B. vollgestopft sind („Phagocyten“) (vergl. Fig. 8) und lockenförmige T.B.-Haufen. Die ganze Darmwand in allen Schichten von T.B. durchsetzt, auch im Darminhalt neben zahlreichen anderen Bakterien viele T.B. Lungen: Nur in Pigmentzellen vereinzelt T.B., keine histologischen Veränderungen. Nieren: Vereinzelt T.B. in den Harnkanälchen und Blutgefäßen.

15) Blindschleiche. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal. 29. Jan. tot. Auf dem Peritoneum zahlreiche Knötchen, die ebenso wie dicke, fibrinöse käsige Lungenauflagerungen enorme Massen von T.B. enthalten. Lungen selbst in den unteren Partien blaß, oben cyanotisch, schlaff. Leber geschwollen, mit kaum sichtbaren weißen Pünktchen. Milz prall, dunkelrot. In Leber, Lungen und Nieren finden sich nur innerhalb und in nächster Nähe der Pigmentzellen T.B., die meisten diesmal in den Nieren. Histologische Veränderungen nicht zu konstatieren.

d) 2 Eidechsen.

16) Eidechse. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen subkutan und intraperitoneal.

In der 3. Woche nach der Infektion wird das bis dahin sehr lebhaftes Tier matt und ist am 27. Jan. tot. Das ganze Peritoneum voller miliärer und submiliärer Knötchen, die enorme Massen von T.B. enthalten. Leber gelb, atrophisch. Mikroskopisch: Die Peritonealknötchen bestehen nur aus Zellen, die mit T.B. vollgestopft sind und wie Leprazellen aussehen. Im subkutanen Bindegewebe an der Infektionsstelle abgekapselte käsige Herde, die lange körnige, bisweilen auch metachromatisch gefärbte T.B. enthalten. Leber aufs hochgradigste verändert, Leberzellen fast vollständig zu Grunde gegangen, verfettet, da, wo überhaupt noch schmale Zellbalken vorhanden sind, finden sich nur minimal kleine Zellkerne. Die ganze Leber von enormen T.B.-Massen durchsetzt. In der Darmschleimhaut finden sich typische Tuberkel mit Riesenzellen und vereinzelt T.B.

(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

Ueber die Aetiologie von „Ekiri“, einer eigentümlichen, sehr akuten, ruhrartigen, epidemischen Kinderkrankheit in Japan.

Von Dr. Sukehiko Ito aus Fukuoka (Japan).

(Schluß.)

Kapitel V.

Widalsche Reaktion.

Vorbemerkungen.

1) Die Widalsche Reaktion führte ich nur an hängenden Tropfen aus, weil es zu schwer war, eine reichliche Menge Blutserum von den erkrankten Kindern zu gewinnen, ohne die Gefühle der Eltern, auf welche der Arzt in Japan besondere Rücksicht nehmen muß, zu verletzen.

Zur Kontrolle hatte ich die Reaktion auch mit Tiereserum ausgeführt.

2) Bei der Gewinnung des Blutes befolgte ich dieselbe Methode, wie bei der Gewinnung humanisierter Lymphe aus vaccinierten Kindern, d. h. die Armhaut wurde mit der Impfnadel gestochen und das erhaltene Blut in Glaskapillarröhrchen aufbewahrt.

3) Unter positiver Reaktion möchte ich folgendes verstanden wissen:

Einzelne Bacillen müssen sich kubisch zu einem so großen Klumpen, daß er makroskopisch oder mit Hilfe der Lupe deutlich wahrnehmbar ist, konzentrisch ansammeln. (Bei deutlichster Reaktion sammelten sich die Bacillen im ganzen Tropfen an, manchmal sogar nur zu einer einzigen großen Masse). Nur einfaches Aufhören der Eigenbewegung oder Stillstehen in kleinen, flachen, einschichtig nebeneinander angesammelten Figuren möchte ich nicht als echte Reaktion betrachten.

4) Ekiri- und andere Bacillen, welche ich zu dieser Untersuchung verwendete, wurden in Bouillon gezüchtet oder auf schräg erstarrte Agaroberflächen gestrichen; die letzteren wurden beim Gebrauch mit sterilisierter Aqua destillata verdünnt. Alle Kulturen hatten 24—48 Stunden im Brutschrank gestanden.

5) Bei der Feststellung der Reaktion einzelner Bakterien hatte ich zur Kontrolle immer auch die Bakterien, denen kein Serum zugefügt war, in gleicher Verdünnung und unter Beobachtung derselben Technik untersucht. Die Bakterien waren auf gleichzeitig bereiteten Nährböden gezüchtet und hatten auch dieselbe Zeit über im Brutschrank gestanden.

6) Der von mir in diesem Kapitel als „Dysenteriebacillus“ bezeichnete hat mit dem von Shiga entdeckten „Bacillus dysenteriae“ dieselben Eigenschaften und denselben agglutinierenden Charakter, der sich durch Hinzufügen des Blutserums von Dysenteriekranken oder von solchen, welche die Krankheit bereits überstanden haben, zeigte. Diesen Bacillus hatte ich aus dem Stuhl des Dysenteriekranken isoliert, nachdem Shiga ihn entdeckt hatte.

I. Widalsche Reaktion der Blutsera, gewonnen von Menschen, die Ekiri überstanden haben, gegen Ekiri-bacillen.

Erster Fall.

A. Krankengeschichte.

5-jähr. Knabe M. T. Ausbruch der Krankheit: 13. Okt. 1898.

Bis zum Tage vorher war er ganz gesund. Am 13. nachmittags hatte er einmal weichen Stuhl in großer Menge; sonst keine besonderen Erscheinungen. Am Abend um 7 Uhr wurde er nach kurzem Bade plötzlich blaß und sah ernstlich krank aus. Um 8 Uhr allgemeine heftige Konvulsion 2 Stunden lang. Nach 3maligem Gebrauch von Chloralhydrat per rectum erst ließ der Krampf nach. Während des Krampfes normale Körpertemperatur; nach dem Krampf aber, gegen 10 Uhr, stieg sie bis auf 38,5° C.

14. Okt. 1898. Fröh Morgens um 2 Uhr Diarrhöe: grünlich, schleimig, mit mehreren erbsen- bis bohnen großen Klümpchen gemengt, aber kein Blut. Die Zahl der Stuhlgänge nicht frequent, bis 8 Uhr 6mal; kein Tenesmus. Ich diagnostizierte aus den obigen Erscheinungen Ekiri. Die Körpertemperatur stieg bis auf 40° C. Von morgens 8—10 Uhr 4mal Diarrhöe von derselben Beschaffenheit. Niemals Tenesmus. Um 10 Uhr vormittags hatte ich die Irrigation des Darmes nach meiner Methode ausgeführt, wobei kleine Mengen von Schleim entleert wurden. Nachmittags einige Stühle mit gelblichen, erbsengroßen Klümpchen und spärlichem Schleim. Um 5 Uhr sank die Temperatur bis auf 38,0° C herab. Befinden des Kindes schon besser. Am 18. vollständig gesund.

B. Widalsche Reaktion.

Am 18. Jan. 1899, also volle 3 Monate nach der Heilung, entnahm ich Blut desselben Knaben und untersuchte es 5 Stunden später, indem ich es 20fach verdünnte. Nach 2 Minuten trat deutlich die Reaktion ein. Kontrollekiribacillen, d. h. solche, denen kein Serum zugefügt war, agglutinierten gar nicht, sogar nicht nach 4 Stunden; sie setzten ihre eigene Bewegung fort, ohne die Lebhaftigkeit derselben zu verändern.

Am 4. Febr., 2 Wochen nach der Gewinnung, wurde getrocknetes Blut mit Aq. dest. gelöst (verdünnt etwa 1:20) und wieder auf seine agglutinierende Wirkung untersucht. Die charakteristische Reaktion fing schon nach 15 Minuten an und war nach 30 Minuten ganz deutlich. In einer Verdünnung 1:50 zeigte sich nach 20 Minuten Reaktion und deutlich nach 50 Minuten.

Zweiter Fall.

A. Krankengeschichte.

3-jähr. Mädchen T. T. (Schwester des vorigen). Ausbruch der Krankheit: 14. Okt. 1898.

Bis zum Tage vorher war das Kind ganz gesund und spielte munter umher. Es hatte regelmäßig jeden Tag einmal geformten Stuhl. Am Morgen des 14. Okt. entleerte sich aber einmal weicher Stuhl. Um 1 Uhr nachmittags trat Fieber ein, 38,8° C, und die Stimmung war schlecht. Um 4 Uhr nachmittags stieg die Körpertemperatur schon bis auf 40,1° C, die Pat. war soporös. Durch Irrigation entleert sich grünlich-schleimiger Stuhl in großer Menge. Nach dieser Applikation wurde sie etwas komatös; Puls schwach, 130 in der Minute. Um 6 Uhr nachmittags trat Konvulsion ein, welche durch Klistier von Chloralhydrat nachließ. Nach dem Klistier entleerte sich Schleim in großer Menge mit vielen erbsengroßen gelblichen Klümpchen, aber kein Blut. Nie Tenesmus. Der Zustand besserte sich immer mehr und am 18. m. c. war die Kleine wieder ganz gesund wie früher.

B. Widalsche Reaktion.

Am 18. Jan. 1898, also volle 3 Monate nach der Heilung, entnahm ich Blut desselben Mädchens, untersuchte es 5 Stunden später. Ich erhielt folgendes Resultat:

Am 18. Jan. In der Verdünnung 1:20 zeigte sich eine deutliche Reaktion erst nach 20 Minuten, 1:10 verdünnt aber schon nach 5 Minuten, in einer Verdünnung 1:5 sogleich deutliche Reaktion.

Am 20. Jan. untersuchte ich 48 Stunden lang auf einer Glasplatte angetrocknetes Blut, indem ich es mit Aq. dest. im Verhältnis 1:10 verdünnte. Die Reaktion war schon nach 3 Minuten erkennbar, nach 5 Minuten aber ganz deutlich.

Resultat der Kontrolluntersuchung fiel genau wie beim ersten Fall aus.

Dritter Fall.

A. Krankengeschichte.

25-jähr. Frau (früher Amme, jetzt Kinderfrau des ersten Kranken). Ausbruch der Krankheit: 15. Okt. 1898.

Am 15. Okt. hatte sie 4malige Diarrhöe von unbekannter Beschaffenheit. Nachmittags trat Fieber ein, das gegen Abend schon bis auf 39,0° C stieg. Der fünfte Stuhl war blutig-schleimig. In der Nacht hatte sie 10mal Stuhlgang. Am nächsten Morgen hörte das Fieber auf. Von 4 Uhr vormittags bis 8 Uhr nachmittags 4mal Stühle von derselben Beschaffenheit. Bei den Stuhlgängen hatte die Pat. niemals Tenesmus.

Anmerkung: Bei den Erwachsenen verläuft die Ekirkrankheit, wenigstens nach meiner Erfahrung, in der Regel rudimentär.

B. Widalsche Reaktion.

Das Blut wurde am 18. Jan. 1899, also volle 3 Monate nach der Heilung, ent-

nommen und 5 Stunden später untersucht in der Verdünnung 1:10. Die Reaktion trat sogleich ein.

Am 6. Febr. untersuchte ich es wieder in der Verdünnung 1:5; die Reaktion war sogleich ganz deutlich. In der Verdünnung 1:10 war sie erst nach 5 Minuten klar erkennbar.

Kontrolluntersuchung genau wie beim ersten Fall.

Vierter Fall.

A. Krankengeschichte.

17-jähr. Mädchen M. K. Ausbruch der Krankheit: 24. Juni 1898.

Bis zum Mittag des genannten Tages war es ganz gesund. Um 5 Uhr nachmittags trat plötzlich Frösteln und hohes Fieber auf, 40,0° C, Kopfschmerz und zweimalige Stühle von weicher, wahrscheinlich nicht besonderer Beschaffenheit. Der Vater, Dr. med. G. K., führte Irrigation des Darmes aus, weil er Ekiri vermutete. In der Nacht hatte die Pat. einige Mal schleimige Stühle ohne Tenesmus. Am 25. Juni 7 Uhr vormittags sah die Pat. sehr matt aus. Gesicht und Mundlippen waren ganz blaß bis erdfarbig. Der Leib war im allgemeinen gegen Druck empfindlich, jedoch nicht gespannt, sondern weich und ohne fühlbare resistente Stelle. Puls sehr schwach und frequent, 150 in der Minute. Stühle eitrig-blutig, mit spärlichem Schleim; Farbe und Konsistenz der Stühle war mit hellrot gefärbtem, halbgekochtem Rührei vergleichbar. Stuhlgänge waren frequent und stündlich 1mal oder alle 3 Stunden 2mal; die einmalige Stuhlmenge war relativ reichlich, etwa 100 g. Bei der Stuhlentleerung wurde keine Spur von Tenesmus beobachtet. Um 10 Uhr vormittags Radialpuls nicht mehr fühlbar. Durch mehrmalige subkutane Injektion mit Kampferöl war er kaum merkbar. Um 6 Uhr abends deutlich fühlbar, aber immer noch sehr schwach. Stuhlgänge waren vom Mittag an nicht mehr frequent und grünlich-schleimig, selten mit Eiter und Blut vermengt. Bei der Pat. wurde 4malige Irrigation des Darmes vorgenommen und 2mal Kalomel und Inf. digit. mit Rotwein per os appliziert. Vom 26. Juni an allmählich gebessert und am 29. keine Diarrhöe mehr, also gesund.

B. Widalsche Reaktion.

Das volle 7 Monate nach der Heilung entnommene Blut wurde 24 Stunden später in der Verdünnung 1:10 untersucht. Negatives Resultat. 36 Stunden später mit anderer Kultur von „Ekiribacillus“ untersucht (auch 1:10); Resultat wieder negativ. Auch in der verminderten Verdünnung 1:2 hatte ich immer nur negative Resultate.

Fünfter Fall.

A. Krankengeschichte.

12-jähr. Knabe J. O. Ausbruch der Krankheit: Sommer 1897.

Nähere Krankengeschichte ist nicht ganz klar, weil dieser Fall nicht auf eigener Beobachtung beruht. Aber es ist nach den Angaben seines Vaters, Prof. Dr. med. H. O. und des Dr. med. G. K. (des Vaters vom vorigen Mädchen, 4. Fall) ganz sicher, daß der Knabe an zweifelloser Ekiri, und zwar in schwerer Form, gelitten hatte.

B. Widalsche Reaktion.

Das am 7. Febr. 1899, also etwa 1½ Jahre nach der Heilung, entnommene Blut wurde 24 Stunden später untersucht. In der Verdünnung 1:10 war die Reaktion sogleich, und bei 1:20 nach 2 Minuten sehr deutlich, bei der Kontrolluntersuchung zeigte sich keine Spur von Reaktion¹⁾.

Resumiert man das Resultat des Kapitels, so ergibt sich:

Der Verfasser hat in 5 Fällen, in denen Ekiri überstanden wurde, das Blut untersucht, um die Widalsche Reaktion beim Ekiribacillus zu prüfen, und folgende Resultate bekommen:

4 unter 5 Fällen fielen positiv aus. Nur 1 Fall, bei dem schon 7 Monate nach der Heilung verlaufen waren, zeigte negatives Resultat. Es ist jedoch möglich, daß bei diesem Fall sogenannte Agglutinine schon aus dem Körper ausgeschieden wurden, weil schon ein ziemlich langer Zeitraum seit der Heilung verstrichen war. Wenn ich die Untersuchung innerhalb 3 Monaten nach der Heilung vorgenommen hätte, so hätte sich wahrscheinlich ein positives Resultat ergeben, wie im 1., 2. und 3. Fall.

1) Das ganze Verfahren bei der Reaktion und der Kontrollreaktion habe ich seiner Zeit auf dem medizinischen Kongreß zu Fukuoka ausführlich demonstriert.

Wie lange Agglutinine sich im Blute halten können, ist von mannigfaltigen Bedingungen, z. B. von der Art, der Schwere der Krankheit, von der Individualität und anderem abhängig, und die Dauer daher sehr schwankend. Aus diesem Grunde ist es leicht erklärlich, warum die Reaktion bei Fall 4 negativ ausfiel, während bei dem 5. Fall, wo die Untersuchung nach viel späterer Zeit (erst nach $1\frac{1}{2}$ Jahren) vorgenommen wurde, ein positives Resultat sich ergab. Nach den Erfahrungen aber, die wir bis jetzt mit Ekiri gemacht haben, ist es sehr schwer zu entscheiden, ob Agglutinine im 4. Fall abnorm lange im Körper aufbewahrt blieben. Doch kann ich nach den Resultaten meiner Untersuchung behaupten, daß das Blut von Menschen, welche Ekiri überstanden haben, nach 3 Monaten, möglicherweise auch nach $1\frac{1}{2}$ Jahren immer noch positive Widalsche Reaktion gegen den Ekiribacillus zeigt und daß deshalb der Ekiribacillus mit der Ekirikrankheit in sehr innigem Zusammenhange steht.

Kapitel VI.

Reaktion des Blutserums von Menschen, welche Ekiri überstanden haben, gegen die dem Ekiribacillus ähnlichen Bakterien.

I. *Bact. coli commune*.

Das Blutserum aus dem 2., 3., 4. und 5. Fall zeigte keine Reaktion gegen den Coli-Bacillus.

Nur das Serum des ersten Kranken (Fall 1) in der Verdünnung 1:20 fing erst nach 30 Minuten an zu agglutinieren. Die Reaktion war jedoch ganz undeutlich; es sammelten sich an etwa 6 Stellen ca. 5—6 Bacillen zu kleinen Klümpchen, während alle übrigen Bacillen isoliert blieben und ihre eigene Bewegung fortsetzten. Diese Erscheinung änderte sich nicht; auch bei wiederholter Untersuchung, sogar noch nach 4 Stunden, blieb das Bild immer das gleiche.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß das Blutserum gesunder Menschen oder solches von früheren typhus-, dysenterie-, darmkatarrh- etc. kranken Menschen selten den Coli-Bacillus agglutiniert und meist nicht sehr deutliche Reaktion zeigt, wie etliche Autoren und ich selbst oft zu beobachten Gelegenheit hatten. Das Serum von einstigen Ekirikranken müßte also, theoretisch betrachtet, ähnlich auf den Ekiribacillus agglutinierend wirken. Von der sicheren Tatsache konnte ich mich aber durch Beobachtung noch nicht überzeugen. Ich habe nur im ersten Fall eine rudimentäre, d. h. so undeutliche und zweifelhafte Reaktion wahrgenommen, daß ich sie nicht für echte Reaktion halten konnte, wie ich schon im vorigen Kapitel erwähnt habe.

II. *Typhusbacillus*.

III. *Dysenteriebacillus*.

Auf diese letzteren beiden Bacillen zeigte das Blutserum aller fünf früheren Ekirikranken keine Spur von agglutinierender Reaktion, während sich für Ekiribacillen sehr deutliche Reaktion ergab, wie ich schon bemerkte.

Kapitel VII.

Reaktion der Blutsera von gesunden und kranken Menschen (außer Ekiri) gegen den Ekiribacillus.

A. Blutserum von gesunden Menschen, d. h. von solchen, welche niemals an Ekiri gelitten haben:

Ich habe in etwa 20 Fällen Serum auf sein agglutinierendes Ver-

mögen gegen Ekiribacillen untersucht, aber niemals eine positives Resultat erhalten.

B. Blutserum von Typhuskranken:

1) Blutserum eines 6-jährigen Knaben, welches am 6. Tage der Krankheit entnommen war, reagierte in der Verdünnung 1:20 auf den Ekiribacillen nicht, während die Reaktion auf Typhusbacillen in gleicher Verdünnung sofort ganz deutlich war.

2) Blutserum eines 27-jährigen Mannes, am 15. Tage nach dem Krankheitsausbruch entnommen, reagierte gegen Typhusbacillen in der Verdünnung von 1:20 nach 5 Minuten deutlich. Gegen Ekiribacillen aber wurde in derselben Verdünnung selbst nach 2 Stunden noch gar keine Spur von Reaktion nachgewiesen.

C. Blutserum von Dysenteriekranken:

1) 8 Monate nach der Heilung entnommenes Blutserum einer 23-jährigen Frau reagierte gegen Satos Bacillen¹⁾ in der Verdünnung 1:10 sogleich deutlich, gegen Ekiribacillen aber unter denselben Bedingungen absolut nicht.

No.	Wie alt?	Diagnose (resp. überstandene Krankheit)	Wann nach der Heilung entnommen?	Reaktion
1	2 J. 11 M.	akuter Darmkatarrh	etwa 10 Monate	keine Reaktion (sogar nicht nach 1 Stunde)
2	1 J. 4 M.	do.	„ 2 „	do.
3	9 M.	do.	9 Tage	do.
4	3 J. 9 M.	do.	11 „	do.
5	1 J. 5 M.	do.	5 „	do.
6	2 J. 7 M.	Ekiri	7 „	Beginn nach 30 Minuten; nach 50 Minuten deutlich
7	2 J. 5 M.	„	8 „	Beginn nach 10 Minuten; nach 20 Minuten deutlich
8	3 J. 10 M.	„	7 „	Beginn nach 15 Minuten; nach 30 Minuten deutlich
9 ²⁾	4 J. 6 M.	„	20 Monate	Beginn sogleich, nach 5 Minuten deutlich

Uebersicht der Resultate.

Serum aus Menschen	Widalsche Reaktion gegen				
	Ekiribacillen	Colibacillen	Typhusbacillen	Dysenteriebacillen	Satos Bacillen
Ekiri	+	selten + ?	—	—	—
Gesunde	—	selten +	selten +	—	—
Typhus	—	selten +	+	—	—
Dysenterie	—	selten +	—	+	+
akut. Darmkatarrh	—	selten +	—	—	—

Anmerkung: + = positives, — = negatives Resultat.

1) Dieser Bacillus, welchen mein Kollege Sato aus einer Dysenteriedejektion isoliert hatte (gehört zur Coli-Bacillengruppe), hat die Fähigkeit, durch Dysenterieserum von Menschen zu agglutinieren. Ähnliche Bacillen hat Shiga auch in den Dysenteriestühlen neben dem Dysenteriebacillus inkonstant gefunden.

2) Gleich Fall II von Ekiri, dessen Blutserum früher (etwa 1½ Jahre vorher) einmal untersucht wurde und positiv ausfiel; vergl. Kapitel V.

Alle übrigen (No. 6, 7 und 8) sind andere Ekirifälle, als im Kapitel V schon angegeben.

2) Das Blutserum einer Frau, die 5 Monate vorher Dysenterie überstanden hatte, lieferte in der Verdünnung 1:10 bei der Untersuchung folgendes Resultat:

- gegen Dysenteriebacillen nach 10 Minuten deutliche Reaktion,
- „ Sato's Bacillen nach 10 Minuten deutliche Reaktion,
- „ Ekiribacillen selbst nach 30 Minuten keine Spur von Reaktion.

D. Das Blutserum von Menschen, welche akuten Darmkatarrh, mit hohem Fieber verknüpft, überstanden hatten:

Die Symptome eines solchen Darmkatarrhs, wenn er mit hohem Fieber akut verläuft, haben, namentlich bei Kindern, gewisse Ähnlichkeit mit Ekiri. Trotzdem werden die beiden Krankheiten von manchen Autoren und auch von mir für wesentlich verschieden gehalten. Um diesen Unterschied beider Krankheiten nicht nur klinisch, sondern auch bakteriologisch resp. durch Anwendung der Widalschen Reaktion als sicher zu bestätigen, hatte ich in mehreren Fällen die Blutsera von solchem Darmkatarrh und von Ekiri nach der im Kapitel IV erwähnten Methode genau untersucht und vorstehendes Resultat bekommen (s. Tab. p. 663).

Kapitel VIII.

Widalsche Reaktion des Blutserums von Ekiri-immunen Tieren gegen Ekiri und ähnliche Bacillen.

Vorbemerkungen: a) Von dem Blutserum der zum Experiment verwandten Tiere (ausgenommen I. Hahn) wurde vorher festgestellt, daß es gegen Ekiribacillen keine Reaktion zeigt. b) Die Verdünnung der Blutsera war 1:10.

I. Hahn.

Das Blutserum eines Hahnes, welcher früher nach Fütterung mit Ekiristuhl an Ekiri gelitten hatte (vergl. α) Hahn), zeigte gegen Ekiribacillen nach 5 Minuten sehr deutliche Reaktion. Dieses Serum wurde in gleicher Verdünnung zur Kontrolle auf seine Reaktion gegen Colibacillen untersucht. Das Resultat fiel negativ aus; selbst in der Verdünnung 1:5 war noch keine Spur von Reaktion nachweisbar.

II. Meerschweinchen.

Das Blutserum eines Meerschweinchens, an welchem nach Fütterung mit blutig-schleimigem Stuhl eines ekirikranken Hahnes (von dem im vorigen Abschnitte gesprochen war) eigentümliche Erscheinungen wahrgenommen wurden (vergl. No. 5 Meerschweinchen), zeigte nach 30 Minuten weniger deutliche Reaktion, als bei dem Hahn.

III. Meerschweinchen (Körpergewicht 410,0 g).

0,5 ccm³) Bouillonkultur von Ekiribacillen, welche 48 Stunden lang im Brutschrank gestanden hatte, wurde in die Bauchhöhle des Tieres injiziert. Nach 48 Stunden fand die Untersuchung von Blutserum dieses Tieres auf Reaktion gegen Ekiribacillen statt. Nach 30 Minuten fing es zu agglutinieren an; nach einer Stunde war die Erscheinung ziemlich deutlich. Kurz nach der Untersuchung wurden dem Tier noch einmal 1,0 ccm Bouillonkultur von Ekiribacillen, welche 96 Stunden lang im Brutschrank gestanden, in die Bauchhöhle injiziert. Nach 5 Tagen, also 8 Tage nach der ersten Injektion, wurde Blut entnommen und untersucht. Die Reaktion gegen Ekiribacillen war nach 30 Minuten ziemlich deutlich.

IV. Kaninchen (Körpergewicht 2190,0 g).

1,0 ccm³) Bouillonkultur der Ekiribacillen, 48 Stunden lang im Brutschrank gestanden, wurde in die Bauchhöhle des Tieres injiziert, dessen Blut 48 Stunden später entnommen wurde. Reaktion gegen Ekiribacillen nach 5 Minuten schon wahrnehmbar und nach 30 Minuten deutlich. Dem Tiere wurden dann wieder 2,0 ccm Bouillonkultur von Ekiribacillen (96 Stunden im Brutschrank) in die Bauchhöhle eingespritzt. Nach 5 Tagen (also 8 Tage nach der ersten Injektion) fand die Untersuchung des Blutes statt. Die Reaktion gegen Ekiribacillen war sofort sichtbar und nach 5 Minuten sehr deutlich.

1) Hälfte der zum Tode führenden Dosis! vergl. oben.

2) Siehe Anmerkung unter III.

Wie diese Resultate zeigen, besaß das Blutserum des Kaninchens die stärkste Fähigkeit, Ekiribacillen zu agglutinieren. Mit anderen Worten, das relativ wirksamste Blutserum gab das Kaninchen. Zur Kontrolle hatte ich das Agglutinationsvermögen des gegen Ekiribacillen sehr wirksamen Blutserums vom Kaninchen gegen Ekiribacillus ähnliche Bacillen, nämlich Typhusbacillen, Dysenteriebacillen und Coli-Bacillenarten nach genau derselben Technik untersucht. Niemals habe ich eine Spur von Reaktion beobachtet, während die verschiedenen Bacillen bei den Kontrolluntersuchungen regelmäßig gegen gleichnamige Immunisierungssera deutliche Reaktion zeigten.

Weil ich das relativ stärkste tierische gegen Ekiribacillen immunisierte Serum von einem Kaninchen gewann, strebte ich danach, auch gegen andere Bacillen immunisierte Sera durch Kaninchen zu erlangen. Ich habe nach verschiedenen langen Zeitabschnitten, je nach den Bacillenarten — bei Typhusbacillen nach der kürzesten, bei Dysenteriebacillen nach der längsten Zeit — gegen gleichnamige Bacillen wirksame Sera bekommen, aber keine gegen Ekiribacillen reagierende.

Uebersicht der Resultate:

Immunisierungsserum gegen	Widalsche Reaktion gegen			
	Ekiribacillen	Colibacillen	Typhusbacillen	Dysenteriebac.
Ekiribacillus	+	—	—	—
Colibacillus	—	+	—	—
Typhusbacillus	—	—	+	—
Dysenteriebacillus	—	—	—	+

Resumé.

Ich fasse die Resultate kurz zusammen und ziehe den Schluß:

1) In den Dejektionen von Ekirikranken habe ich einen pathogenen Bacillus gefunden, welcher morphologisch dem Coli-Bacillus ähnelt und, nach Gram entfärbt, lebhaft Eigenbewegung hat (viel intensiver als der Coli-Bacillus), Gelatine nicht verflüssigt, in Traubenzuckeragarnährboden Gas entwickelt, durch merkwürdig verzögerte Indolreaktion charakterisiert ist (viel später als bei Coli-Bacillen) und Milch nicht koaguliert.

2) Dieser Bacillus wurde bisher niemals, weder bei gesunden¹⁾ noch kranken Menschen, gefunden.

3) Diese Bacillen werden durch Zusatz von Blutserum von Menschen, welche Ekiri überstanden haben, immer deutlich agglutiniert, wenn nicht nach deren Heilung schon eine lange Zeit verflossen ist.

4) Diese Bacillen reagieren niemals auf Blutserum von gesunden Menschen, selbst nicht von solchen, welche eine Ekiri-ähnliche Krankheit, z. B. Dysenterie, akuten Darmkatarrh mit hohem Fieber etc., überstanden haben oder noch daran leiden.

5) Das Blutserum von Menschen, welche Ekiri überstanden haben, ist nicht im stande, andere, dem besprochenen ähnliche Bacillen, z. B. Dysenterie-, Typhusbacillen oder Coli-Bacillenarten, zu agglutinieren.

1) Eine Art von Coli-Bacillus, dessen Morphologie und kulturelles Verhalten diesem Bacillus sehr ähnlich ist, hat Tsuyuki im Stuhl eines gesunden Menschen gefunden. Aber durch die Widalsche Reaktion der gegen seinen und meinen Bacillus immunisierten Tierblutsera konnte er einen deutlichen Unterschied zwischen beiden nachweisen.

6) a) Die Blutsera verschiedener Tiere, welche gegen diesen Bacillus immunisiert worden sind, agglutinieren ihn allein.

b) Die Blutsera von Tieren, welche gegen ähnliche Bacillen, wie Dysenterie-, Typhusbacillen und Coli-Arten, immunisiert worden sind, d. h. gegen solche, die dem von mir gefundenen Bacillus ähneln, agglutinieren den letzteren niemals, während gleichnamige Bacillen ausnahmslos zur deutlichen Agglutination kommen.

Diese Resultate haben klar erwiesen, daß der besprochene Bacillus mit der Ekirikrankheit im engsten Zusammenhang steht. Ich halte daher diesen Bacillus für den Erreger der Ekirikrankheit und nenne ihn „Ekiribacillus“.

Druckfehler und Berichtigung.

p. 509	Zeile 4	von oben	Sukehiko Ito	anstatt Sukehito Ito,
„ 510	„ 21	„	3)	anstatt C),
„ 510	„ 25	„	9 Fälle	anstatt 99 Fälle,
„ 511	„ 10	„ unten	39,5° C	anstatt 30,5° C,
„ 512	„ 26	„ oben	1/4 Uhr nachmittags	anstatt vormittags,
„ 512	„ 28	„	16. März 1/2, 10 Uhr vormittags	anstatt 1/2, 10 Uhr nachmittags,
„ 512	„ 1	„ unten	getrübt	anstatt geprüft.

Nachdruck verboten.

Les Epithéliomas parasitaires. La clavelée et l'Epithélioma claveleux.

Par F. J. Bosc, Professeur à l'université de Montpellier.

Avec 3 planches et 6 figures.

(Schluß.)

Nature des inclusions.

A. Les inclusions ne sont pas des produits de dégénérescence cellulaire: on ne peut pas les confondre avec les gouttelettes de kérato-éleïdine, ni avec les petites masses hyperchromatiques résultant de la kératinisation du noyau (pl. I, fig. 1, c, c). Dans le cas où la chromatine dégénérée ne prend plus les colorants nucléaires, on la distinguera des inclusions par son absence de structure et par l'existence d'une membrane plissée au voisinage. La chromatine du noyau vacuolisé peut traverser la membrane et former des boules protoplasmiques ou perinucléaires (bo, bo, fig. 1, pl. I) mais elles sont opaques homogènes et se réduisent en poussière (d, d, fig. 1, pl. I). La dégénérescence colloïdo-cornée d'une cellule peut aboutir à la formations d'une petite masse colorée en violet sombre par l'ématéine-éosine, puis en violet clair et en rose (pl. I, fig. 1, x), mais elle est opaque, rigide, figée et intercellulaire; ces corps peuvent se liquéfier et prendre des formes pseudopodiques faciles d'ailleurs à distinguer des inclusions. La dégénérescence colloïdocornée d'une cellule incluse quoique produisant un corps intracellulaire, ne donnera pas lieu à confusion à cause de son opacité et de sa rigidité.

B. Nos inclusions ne proviennent pas des leucocytes. A son début, la pustule qui est uniquement due à la prolifération épithéliale, renferme des inclusions et ne présente aucun leucocyte. Dans la pustule cutanée au 4. et 5. jours chaque cellule renferme une inclusion (pl. I, fig. 4); les inclusions sont donc innombrables et cependant on ne rencontre aucun leucocyte dans toute l'étendue de la prolifération épithéliale, et, dans le tissu conjonctif, on ne trouve que des mononucléaires dans et autour des vaisseaux et quelques très rares polynucléés. Ce n'est qu'à partir du 10. jour que les polynucléaires apparaissent dans le tissu conjonctif puis dans la proliférations épithéliale de la pustule; ils augmentent rapidement et leur présence est uniquement en rapport avec le processus de regression de la pustule.

On pourrait dire que les polynucléaires ne sont pas aperçus, au début, parce qu'ils éclatent en fragments nombreux qui pénètrent dans les cellules épithéliales. Mais quelles sont donc ces cellules épithéliales qui escamotent si rapidement des débris de leucocyte et pourquoi y aurait-il autant de polynucléaires alors qu'il n'y a aucune trace de polynucléose. Comment, enfin expliquer que ce petit nombre de leucocytes puisse, quelle que soit la puissance de leur éclatement, produire ce nombre colossal d'inclusions!

D'ailleurs si l'on examine la pustule alors qu'elle contient réellement de nombreux polynucléaires, il est impossible de démontrer objectivement la transformation d'un polynucléaire en inclusion, alors qu'on suit parfaitement l'étirement des leucocytes dans les interstices cellulaires, leur retour à la forme ronde dans les vésicules et leur dégénérescence.

Il est donc impossible de confondre un leucocyte vivant avec une inclusion. Les fragments de noyaux de leucocytes sont en outre colorés en vert par l'Ehrlich tandis que le parasite est rouge.

Les noyaux de leucocytes dégénérés et prenant mal la couleur ont ordinairement un siège intercellulaire ou vésiculaire intra- ou extracellulaire; de plus, leur forme, leur épaisseur, leur opacité, l'absence de toute structure, permettra de les distinguer.

La dégénérescence colloïde des leucocytes produit des boules safranophiles qui ne prêtent pas à confusion.

Les inclusions claveleuses ne sont point d'origine leucocytaire et si Borrel revient à l'ancienne opinion de Salmon (pour les inclusions de la vaccine) c'est par ce qu'il n'a pas vu la structure si précise et si particulière que nous avons décrite; il s'est attaché à des figures altérées. Il ne présente d'ailleurs aucun argument important en faveur de cette origine leucocytaire.

C. Nos inclusions sont-elles des parasites? — A la suite de nos recherches sur la structure si précise et si spéciale des inclusions et après avoir montré qu'on ne pouvait les interpréter comme un produit de dégénérescence cellulaire ou leucocytaire, nous avons pensé qu'il s'agissait d'un véritable parasite. Les divers cycles évolutifs figurés dans nos planches ont fait penser, non seulement à nous, mais à des savants compétents dans l'étude des protozoaires, que nos formes se rapprochaient, à un très haut degré, des formes d'évolution sporozoaires. On ne peut pas ne pas être frappé, si l'on examine nos figures, de la ressemblance frappante des inclusions avec un corps plasmodial nucléé, à ondulations et digitations amiboïdes. L'examen des figures *gr, gr*, fig. 15, pl. II et fig. 14, pl. II, ne frappera pas moins par leur

ressemblance avec les stades de divisions qui comptent parmi les plus caractéristiques des sporozoaires. Le seul stade que nous n'ayons pas pu observer est le stade terminal de reproduction à sporozoïtes volumineux et typiques et c'est parce que de stade est celui qui permettrait de conclure d'une façon définitive, que nous avons préféré changer le nom de «maladies à sporozoaires» contre celui plus général de «maladies bryocytiques» (Presse médicale. 1903. 14 févr.). Mais nous pensons toujours que nos inclusions représentent bien réellement des parasites vrais intracellulaires de la classes des sporozoaires ou des parasites très voisins et on n'a donné aucun argument sérieux pour modifier notre manière de voir. Nous n'avons donc nullement changé d'opinion, quoique Borrel fasse tous ses efforts pour le persuader et actuellement nous considérons les fines divisions chromatiques qui se portent à la périphérie des corps protoplasmiques comme de vrais chromatozoïtes. En outre la présence de divisions karyokinétiques est de la plus haute importance.

Un des arguments mis en avant peut être avec trop de précipitation contre la nature parasitaire de nos inclusions a consisté à dire que le virus claveleux passait à travers les bougies; que, par suite il ne pouvait plus être question de la nature parasitaire de nos inclusions, celles-ci étant trop volumineuses pour traverser les filtres de porcelaine; que le virus claveleux ne pourrait être qu'un microbe et un microbe trop petit pour être perçu avec nos grossissements, un microbe invisible.

Nous fîmes remarquer que ce n'était là qu'une affirmation, non une démonstration et qu'en admettant que le fait de la filtration isolée du virus claveleux fut vraie elle n'infirmerait en rien la nature parasitaire de nos inclusions. Dans les publications où cette filtration isolée très sommairement rapportée, on remarquait, en effet, qu'il fallait attendre très longtemps, 6 à 7 jours, le passage du virus claveleux à travers la bougie de porcelaine, ce qui n'est pas compréhensible s'il s'agit d'un microbe invisible, mais ce qui s'accorde très bien avec la nature amiboïdienne de nos inclusions. C'est ce que nous avons fait remarquer à plusieurs reprises et nous ajoutions qu'il était d'ailleurs permis de penser également que nos inclusions volumineuses pouvaient avoir des formes de reproduction d'une extrême petitesse et capables de traverser très filtres, au même titre que certains chromatozoïtes situés à la limite de la visibilité. C'est ce que nos formes de division poussées jusqu'à l'invisible (fig. 5, pl. II) nous permettent actuellement de soutenir.

La lecture du travail de Borrel (Ann. de l'Inst. Pasteur. 1903. 29 févr.) nous a montré d'ailleurs ce qu'il fallait entendre par filtration isolée du virus claveleux. A travers la bougie F, le virus ne passe qu'au bout de 7 à 8 jours. Pour les autres bougies à pores plus considérables (Berkefeld, Garros, Chamberland, F¹ à F¹⁰), le virus claveleux passe, mais, d'après Borrel lui-même, toutes les fois qu'il passe, il ne passe pas seul: le liquide de filtration cultive et montre de multiples espèces microbiennes. Pour pallier ce résultat qui renverse complètement la notion de l'invisibilité du virus claveleux, Borrel fait remarquer que les microbes qui passent sont ciliés. Il n'en est pas moins vrai que le virus claveleux n'est plus un microbe invisible; il n'est plus, Borrel doit l'avouer, qu'un microbe petit. Mais si c'est un microbe petit pourquoi ne le voit-on pas, un microbe étant bien plus facilement mis en évidence qu'un plasmode délicat que la dessi-

cation détruit. Quant à la constatation de la nature ciliée des microbes qui passent, elle devient le meilleur des arguments en faveur de l'opinion que nous avons émise, à savoir que nos inclusions, même dont le diamètre est de $\frac{1}{2} \mu$, doivent passer encore plus facilement que des bactéries grâce à leur nature plasmodique et à leur forme qui laisse penser à l'existence de mouvements amiboïdes; elles pourront s'étirer et passer par reptation à travers les bougies serrées si on leur donne un temps assez long, à moins qu'elles ne passent à travers la bougie F que par un simple phénomène de colmatage rapide. Nos très fines granulations imperceptibles laissent admettre l'invisibilité sans avoir recours à des microbes invisibles.

On peut encore opposer à la nature microbienne d'un virus aussi actif, sa limitation assez prolongée dans la pustule d'inoculation, la limitation de la virulence à l'étendue de la pustule, l'affinité si particulière du virus pour les cellules épithéliales, l'identité de structure de toutes les lésions suivant un type si particulier de prolifération épithéliale avec désorientation et envahissement profond, caractères qu'aucun microbe ne peut reproduire et qui s'accordent parfaitement avec l'hypothèse d'un parasite vrai à évolution intracellulaire.

En outre, les lésions de la clavelée étant identiques à celles du cancer épithélial, admettre l'origine microbienne de la clavelée, ce qui ne choque pas trop car il s'agit d'une maladie aiguë, c'est l'admettre pour le cancer, ce qui choque, la progression lente et localisée de ce dernier et son faible caractère virulent paraissant s'opposer à toute idée de nature bactérienne.

III. Histogénèse.

Au point de vue histogénétique, le début des proliférations épithéliomateuses claveleuses se fait au niveau des cellules épithéliales de chacun des organes lésés. Ces cellules prolifèrent, s'hypertrophient; la prolifération progresse vers l'épithélium sain, mais elle est surtout intense dans la masse néoplasique elle-même et en particuliers sur les bords où les karyokinèses sont nombreuses et elle aboutit à l'envahissement des tissus profonds. Ces néoformations épithéliales suivent une progression régulière du papillome à l'épithéliome à globes épidermiques pour les pustules du revêtement malpighien et de l'adénome à l'adéno-épithéliome, à l'épithéliome typique et au carcinome pour les tissus glandulaires. Nous avons noté enfin que, au même titre que dans le cancer, les bourgeonnements profonds sont accompagnés d'une zone de transformation embryonnaire très active et néovasculaire, avec endopérivasculaire, du tissu conjonctif profond.

La période d'accroissement de la pustule par prolifération épithéliale, avec légère mononucléose dans le sang, dure une dizaine de jours; à cette période d'édification fait suite une période de ramollissement, avec appel énergétique de polynucléaires, aboutissant à la vésiculation, à la nécrose et à la chute de la pustule. Nous savons également que pendant la période active de la prolifération épithéliale de la pustule d'inoculations, la virulence demeure localisée dans cette pustule et que ce n'est qu'au moment de la dégénérescence vésiculeuse des cellules de la partie centrale de la pustule que le virus est diversé dans le sang. Mais il ne demeure pas en très grande quantité dans le sang; il semble que le sang n'est qu'un lieu de passage (comme nous l'avons indiqué C. R. Soc. de Biol. 1902) pour le virus qui va se fixer aussitôt sur les surfaces

épithéliales des divers organes pour y provoquer de nouvelles formations néoplasiques épithéliales.

Etant donné le peu d'intensité de la mononucléose de la période d'édification incapable de constituer une défense réelle de l'organisme, nous avons été amené à penser (C. R. Soc. de Biol. 1902) que la prolifération cellulaire qui constitue la pustule doit être interprétée, au même titre que le granulome de nature conjonctive, comme la phénomène défensif véritable, les mononucléaires ne constituant (leur englobement des inclusions démontre leur rôle défensif), qu'une sorte de circonvallation défensive plus éloignée. L'arrivée des polynucléaires dans le sang et dans la pustule et leur pullulation particulièrement intense, correspond à la phase de ramollissement et aux progrès de la dégénérescence cellulaire avec infection microbienne secondaire. Cette polynucléose apparaît nettement comme une réaction phagocytaire de nettoyage (C. R. Soc. de Biol. 1902) destinée à éliminer les tissus nécrosés et les microbes.

La lésion clavelleuse évolue donc comme un épithélioma capable de regresser après une période d'accroissement rapide: elle constitue un épithélioma parasitaire de haute virulence, contagieux et inoculable, à marche aiguë ou subaiguë, localisé ou généralisé, capable d'aboutir à la mort ou à la guérison.

Il s'agit bien réellement d'un épithélioma: tous les caractères que nous avons énumérés comme propres à chacune des lésions clavelleuses sont calqués sur les caractères que l'étude histogénétique reconnaît aux cancers épithéliaux malpighiens ou glandulaires.

Nous avons prévu les objections que l'on peut faire à cette assimilation (Presse méd. 1903. 14 févr.), et il n'en est aucune qui ne puisse être repoussée.

On pourrait objecter, par exemple, que la clavelle est une maladie passagère, à lésions généralisées, tandis que le cancer est une maladie à lésion localisée dont l'évolution progressive aboutit à la mort. Mais nous savons que la lésion clavelleuse peut demeurer limitée à une pustule d'inoculation d'un volume énorme, et que le cancer peut présenter, dans la carcinose aiguë, une marche infectieuse avec généralisation pustuleuse à tous les tissus. Il nous sera en outre permis d'appuyer notre argumentation sur l'existence de nos inclusions dans le protoplasma des cellules épithéliales proliférées et sur la possibilité de leur rôle parasitaire. Cette hypothèse du siège intracellulaire et de la nature parasitaire vraie du virus clavelleux ne s'appuie pas seulement sur la présence de ces inclusions; d'autres parasites sont bien déterminés, comme les levûres, capables de provoquer des proliférations cellulaires intenses, avec hypertrophie et nous avons montré (Presse méd. 1903. 14 févr.) que moins ces parasites vrais sont virulents et plus la prolifération cellulaire est intense, durable et localisée au point primitif. Il nous est donc permis de penser que, tandis que le virus clavelleux pullule rapidement et présente une virulence rapidement destructrice des cellules, le virus cancéreux bien moins virulent peut vivre longtemps dans la cellule cancéreuse parasitée. Celle-ci est en état d'excitation nutritive et par suite prolifère, de sorte que l'on comprend que l'accroissement de la néoplasie se fasse aux dépens de ses cellules elles-mêmes, c'est à dire in loco, tous les parasites étant englobés par la prolifération cellulaire que provoque au fur et à mesure une pullulation parasitaire peu intense.

Ces considérations nous seront utiles pour répondre à une autre objection plus considérable en apparence et qui consiste à dire qu'il existe une différence radicale entre la prolifération épithéliale claveuse et le cancer épithélial, parce que les lésions pustuleuses de la clavelée sont dûes à la prolifération des épithéliums propres de chacun des organes lésés tandis que les noyaux cancéreux métastatiques reproduisent le type d'une prolifération néoplasique primitive. Mais la limitation de la prolifération cancéreuse au point d'inoculation indique que le parasite est dépourvu de virulence directe ce qui lui permet de demeurer comme les parasites vrais, enfermé pendant toute la durée de son évolution dans la cellule cancéreuse. Et comme toute irritation chronique spécifique détermine une excitation nutritive et reproductrice des cellules atteintes, il faudra dans l'étude générale des cancers tenir compte de deux faits essentiels: l'englobement du parasite dans la cellule et, de ce fait, l'excitation reproductrice karyokinétique des cellules néoplasiques qui permettant à celles-ci d'englober les parasites nouveaux au fur et à mesure de leur pullulation. Si ces cellules néoplasiques parasitées en puissance de reproduction pénètrent dans un conduit lymphatique elles pourront y pulluler comme dans un espace du tissu conjonctif et arriver progressivement au ganglion correspondant; on bien quelques unes pourront être prises par le courant lymphatique ou le courant sanguin et produire, au loin (grâce, à la fois, à leur force de reproduction et à leur parasitisme), des foyers nouveaux qui devront reproduire exactement et fatalement les caractères du foyer primitif. Les métastases du cancer ne sont donc pas autre chose que des greffes de cellules néoplasiques parasitées. L'élément virulent est le parasite, mais la résistance des cellules et leur force de reproduction constituant un élément essentiel du développement du nouveau foyer.

Si, au contraire, dans la clavelée, l'épithélium du chaque organe prolifère néoplasiquement pour son compte, c'est parce que les parasites tuent les cellules rapidement passent dans le sang il ne s'agit plus ici d'une greffe de cellules mais de parasites libres qui abordant une surface épithéliale ne pourront que faire proliférer les cellules épithéliales qui la constituent.

D'ailleurs si l'on étudiait plus attentivement les cancers à évolution rapide nous pensons que l'on trouverait plus souvent qu'on ne croit des localisations multiples dûes à des proliférations des épithéliums locaux. Nous avons, en particulier, observé un cas d'épithélioma atypique glandulaire du sein évoluant au voisinage d'un épithélioma pavimenteux lobulé à globes épidermique; nous avons vu une tumeur épithéliale glandulaire du corps utérin évoluer avec un sarcome fuso-cellulaire.

Si l'on étudie, en outre, le cancer et la clavelée, dans certains de leurs traits généraux on constate que dans le cancer, comme dans la clavelée, il existe une mononucléose légère la prolifération épithéliale paraissant jouer à elle seule, le rôle de barrière défensive, qui use par son étendue et sa durée les forces nutritives de l'organisme pour aboutir, sans doute avec l'aide des sécrétions parasitaires légères mais accumulées, à la cachexie terminale. Il faudrait donc envisager la tumeur cancéreuse comme une pustule d'inoculation à développement indéfini capable d'envoyer par les vaisseaux des greffes de cellules en hypernutrition et parasitées qui constitueront l'origine des métastases.

L'existence d'un épithélioma parasitaire fait entrer les cancers dans la catégorie des maladies virulentes inflammatoires. Nous avons longuement développé ailleurs cette idée (Presse médicale. 1903. 14 févr.); nous avons montré la place que le cancer doit occuper dans les stades successifs de l'inflammation, et cette étude en nous faisant passer en revue les différentes espèces de parasites et leur mode d'action sur les tissus nous a démontré encore avec plus de force la nécessité d'admettre pour la clavelée l'existence de parasites spéciaux, de parasites vrais, non microbiens et à l'évolution intracellulaire.

L'inflammation en effet doit être caractérisée surtout par la prolifération et l'activité des éléments cellulaires: tantôt ce sont les cellules mobiles polynucléaires et l'on est en présence de l'hyperleucocytose polynucléaire caractéristique des maladies microbiennes aiguës; tantôt ce sont des mononucléaires qui augmentent de nombre en même temps que prolifèrent les cellules conjonctives fixes, pour constituer le granulome. Il s'agit dans le dernier cas de bacilles à localisation plus étroite, à vie plus durable, mais d'action nécrosante comme le bacille tuberculeux. A mesure que la virulence du parasite diminue, on voit, la prolifération conjonctive augmenter de volume et de durée; elle peut aboutir à la formation de tumeurs volumineuses, avec les levûres qui représentent le type parfait du parasite intracellulaire peu toxique. Cette constatation vérifie donc complètement ce que nous disions, dans notre comparaison de la clavelée et du cancer.

Mais les levûres sont non seulement susceptibles de former des tumeurs conjonctives; elles paraissent pouvoir provoquer la formation de tumeurs adénomateuses étendues (Wlaëff). Mais ces formations ne paraissent pas dépasser le stade de l'adénome, l'on n'a pas prouvé leur virulence et l'examen histologique montre au contraire que les cellules épithéliales ne ferment pas de levûres. Il s'agit sans doute de phénomènes d'irritation de voisinage qu'il est possible de rapprocher des papillomes de la vessie développés sous l'influence d'œufs de Bilharzia.

Ces faits tendent néanmoins à montrer que ce ne sont pas seulement les cellules mobiles et les cellules fixes conjonctives qui réagissent devant les agents inflammatoires mais aussi la cellule épithéliale et avec des caractères importants de volume et de durée. Ils laissent entrevoir la possibilité pour les épithéliums de constituer, par eux seuls, et primitivement, une stade nouveau et différencié du processus inflammatoire. Avec l'épithélioma clavelé nous avons établi définitivement l'existence de cette étape épithéliale des processus inflammatoires qui fait entrer le cancer dans les maladies inflammatoires parasitaires. Et comme aucun des parasites connus y compris les levûres n'est capable de provoquer ces néoformations épithéliomateuses nous sommes amenés à admettre l'existence d'un parasite spécial qui, d'après les caractères mêmes des néoformations doit être un parasite vrai, un hôte de la cellule à laquelle il donne sa virulence et sous aptitude à proliférer. Nos inclusions répondent à ces conditions et elles n'agissent pas autrement que *Coccidium oviforme* auquel nous avons vu produire d'énormes proliférations adéno-papillomateuses et qui, vivant dans les cellules dont il active la nutrition, ne les tue qu'au bout d'un temps très long et autant par compression que par épuisement.

Mais ce n'est pas seulement dans la clavelée et le cancer que se montrent ces proliférations épithéliales parasitaires spéciales. Nous avons prouvé qu'il existait tout un groupe de maladies, la variole, la vacc

la fièvre aphteuse la syphilis... qui présentent non seulement les mêmes caractères histologiques, mais les mêmes traits symptomatiques généraux et spéciaux (chancre d'inoculation, éruption pustuleuse), la même formule leucocytaire, la même possibilité de septicémie passagère après localisations plus ou moins longue au niveau de l'accident primitif; enfin des parasites de même ordre, de même structure, se retrouvent dans les cellules néoplasiques qui constituent les lésions de chacune de les maladies. Il s'agit donc là d'un groupe homogène que nous avions désigné sous le nom de «maladies à sporozoaires». Ce titre nous paraît toujours juste, mais en attendant que la forme d'évolution à chromatozoïtes volumineux soit découverte nous désignerons le parasite d'après le caractère essentiel des réactions qu'il provoque et qui est de faire proliférer les cellules, d'où le nom de bryocytobes ou plus euphoniquement (bryocyte (de βρύειν, faire proliférer, κύτος, cellule). Le nom de bryocytoses ou maladies bryocytiques permettra donc de désigner le groupe morbide nouveau que nos recherches ont établi¹⁾.

Légende explicative des planches.

Planche I.

Figure 1. Coupe de pustule cutanée; partie superficielle (Zeiss, obj. imm. hom.; oc. 6. comp.). Coloration par l'hématéine-éosine: *co, co*, lames cornées superficielles dépourvues de noyau; *d, d*, fragments de chromatine dispersés dans le protoplasma et entourés d'une zone claire; *bo, bo*, noyaux vésiculeux dont la chromatine exsudée forme des gouttelettes autour de la membrane nucléaire; *glo, glo*, globes cornées à cellule centrale hydropique renfermant une inclusion parasitaire nucléée *in*; *np*, noyau vésiculeux, vidé et recroquevillé dans la cellule vésiculisée (*ves*); *ve, ve*, cellules en dégénérescence vésiculo-granuleuse; *no*, noyau vésiculeux; *c, c*, noyaux hyperchromatiques en voie de disparition; *h*, noyau dont la chromatine dissonte a fortement pâli; *z*, cellule la transformation colloïdo-cornée; *hi, i, li*, parasite nucléé.

Figure 2. Coupe de pustule pulmonaire jeune (Zeiss, obj.; oc. 6. comp.; coloration par l'hématoxylin ferrique de Heidenhain): *bo*, volumineuse bourgeon épithélial forme de cellules atypique et remplissant la plus grande partie de la lumière bronchique; *in, in*, inclusions enfermées dans les cellules épithéliales; *n, n*, noyaux en dégénérescence vésiculeuse; *bas*, basale conservée; *p, p*, leucocytes et débris de leucocytes (*dl*); *cl, cl*, grandes cellules conjonctives claveleuses; *en, en*, grandes cellules claveleuses d'origine endothéliale; *alv, alv*, alvéoles pulmonaires revêtus on remplis par une prolifération avec hypertrophie intense des cellules épithéliales; *apl*, alvéole pulmonaire absolument rempli par la prolifération de cellules volumineuses et atypiques.

Planche II.

Figures 1 à 14 Raclages de pustule cutanée fixés par le Flemming sans dessiccation et colorés par la safranine anilinée et le picro-indigo-carmin; Zeiss, obj. imm. hom. oc. 12. comp.

1) Il sera intéressant pour le lecteur de prendre connaissance de nos travaux depuis 1900 (C. R. Soc. de Biol., Arch. de méd. expér., Presse méd. 1903. 14 févr.), et de lire ensuite le mémoire de Borrel paru dans le No. du 25 février des Annales de l'Institut Pasteur. On y retrouvera toutes nos idées, en particulier la constitution du nouveau groupe morbide que j'ai cependant établie dès 1901; on y retrouvera l'étude de nos inclusions dont notre première description remonte à 1900; on y retrouvera la description des lésions épithéliales claveleuses des organes dont nous avons commencé la description méthodique en 1901, et tout cela, sans que nos recherches soient même signalées, comme si on voulait laisser penser au lecteur que rien n'a été fait auparavant. Nous nous trompons cependant: Borrel veut bien dire que nous avons trouvé des parasites dans le sang et il le dit de telle façon qu'il semble que nous rien ayons trouvé que là, et il le dit aussi pour pouvoir — sans aucune preuve — nier la virulence du sang. Il se demande même «ce que Bosc veut démontrer» en nous lançant à la tête des expérimentateurs «qui ont fait leur preuve». Nous avons trop l'habitude de respecter les travaux des autres pour que nous laissions jamais sans réponse des procédés que nous livrons au jugement des hommes impartiaux.

Figure 1. Cellule épithéliale renfermant une inclusion homogène et nucléée de petite taille (*a*); *ha*, zone hyaline périphérique; *n*, noyau vésiculeux.

Figure 2. Cellule qui renferme une inclusion homogène volumineuse, entourée d'une zone hyaline plus vaste et renfermant un noyau à chromatine rayonnée.

Figure 3. L'inclusion intracellulaire (*gr*, fig. 3), présente 2 parties: l'un centrale renferme le protoplasma homogène et nucléé et l'autre de fines granulations.

Figure 4. Il ne reste de la partie centrale de l'inclusion que deux masses résiduelles (*x*); le noyau, achève de se diviser dans la partie granuleuse périphérique du protoplasma.

Figure 5. La masse finement granuleuse se divise autour des fragments nucléaires (*r*) en granulations extrêmement fines, invisibles (chromatozoïtes).

Figure 6. Cette division aboutit à la formation de corpuscules nucléés (*ch*) identiques à ceux que nous avons près comme point de départ (*a*, fig. 1, pl. I).

Figure 7. Inclusion volumineuse à gros noyau rayonné (*a*).

Figure 8 et 9. Inclusions en voie de karyokinèse; *ce* corps centrosomiques (?).

Figure 10 et 11. La chromatine rayonnée s'étale en un long cordon (*a*, fig. 11 et *t*, fig. 12) qui se subdivise en petits fragments (*d*, fig. 13); ces fragments deviennent ronds et se disposent en chapelet des fines granulations autour de lamasse résiduelle (fig. 14).

Figure 15. Coupe d'une pustule cutanée: *a*, vacuoles protoplasmiques; *n*, *n*, noyau vacuolisés, avec condensations en boules de la chromatine; *gr*, *gr*, inclusions de structure très précise avec des grains de chromatine disposés vers la périphérie (rouge de Magenta phéniqué micro-indigo-carmin; Zeiss, obj. imm. hom.; oc. 12 comp.).

Figure 16. Coupe de carcinome claveleux de la mamelle: *t*, *t*, boyaux cellulaires épithéliaux; *v*, *v*, vaisseaux.

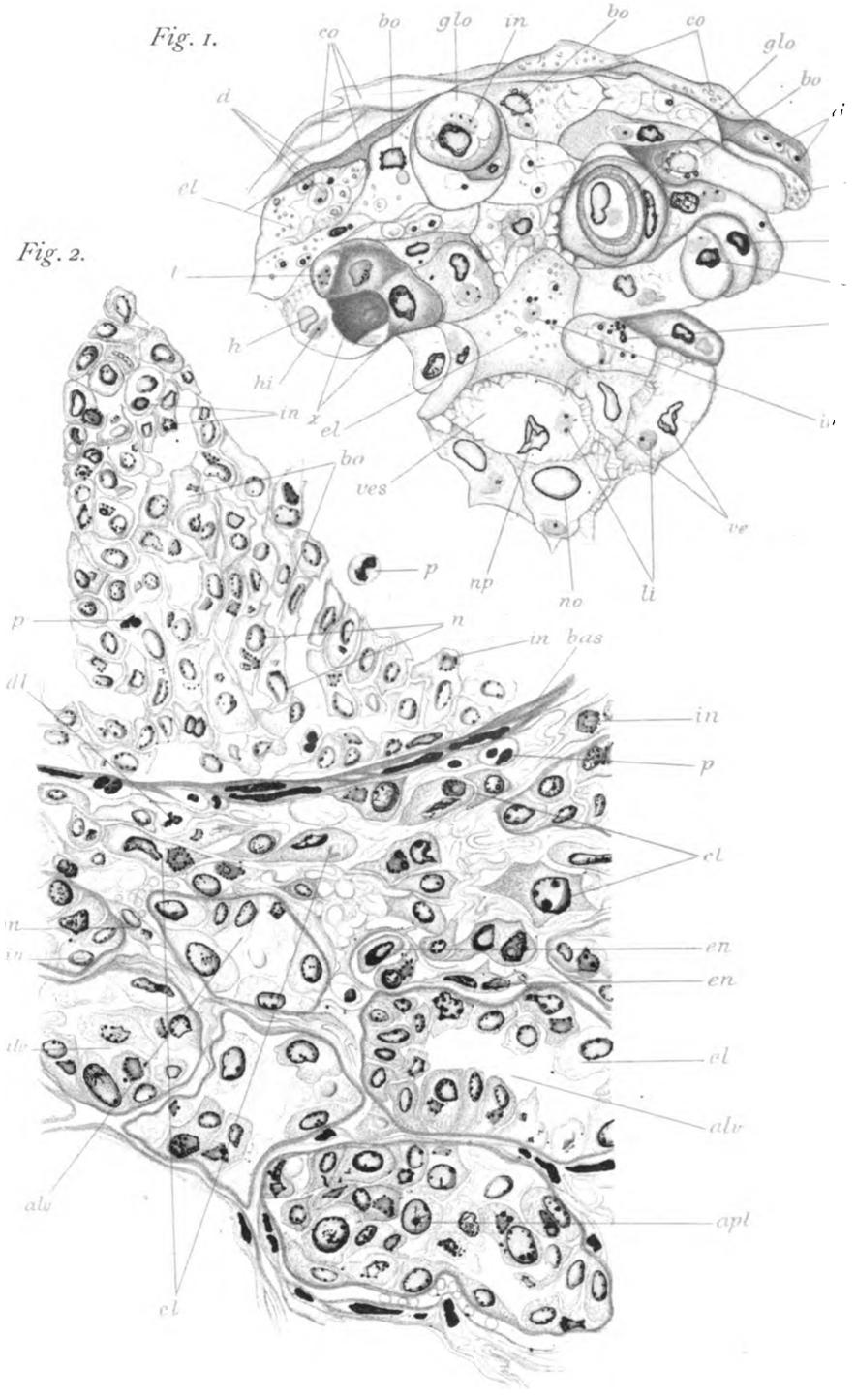
Figure 17. Partie conjonctive oedématisée profonde de la pustule: *cl*, *cl*, *cl*, grandes cellules conjonctives claveleuses, avec ou sans prolongement visibles (*pr*) et qui en s'anastomosant forment unetrame lâche; *n*, *n*, *n*, noyaux vésiculeux; *in*, *in*, *in*, inclusions nucléées; *mo*, *mo*, leucocytes mononucléés (Flemming, coloration par la safranine anilinéé suivie de micro-indigo-carmin; Zeiss, obj. imm. homog.; oc. 12 comp.). (Les figures de cette planche II ont été présentés à la Soc. de Biol. le 1. févr. 1902.)

Planche III.

Figure 1. Coupe de pustule du foie: début de lésion épithéliomateuse: *cl*, *cl*, grandes cellules en hypertrophie claire; *a*, *a*, *a*, *a*, boyaux et amas de grandes cellules atypiques, claires ou demiclares, desorientées; *k*, cellule hypertrophiée en voie de karyokinèse un niveau d'un point de prolifération; *tra*, *tra*, travées hépatiques encore reconnaissables; en *t*, *t*, *t*, on saisit la transformation de la cellule hépatique normale, en cellule hypertrophiée claire, puis en cellule atypique; *rio*, cellule hépatique en karyokinèse; *cp*, *cp*, capillaires à cellules endothéliales transformées en grandes cellules claveleuses (safranine, micro-indigo-carmin; Zeiss, obj. imm. hom.; oc. 6 comp.).

Figure 2. Adénome du poumon: *p*, *p*, alvéoles remplis de cellules épithéliales volumineuses et claires (hypertrophie claire); *al*, *al*, alvéoles qui présentent encore une lumière et ressemblent à un coupe d'acinus de glande sous maxillaire; *c*, *c*, grandes cellules claires; *f*, bourgeonnement cellulaire aboutissant à la formation d'un nouvel acinus; *n*, *n*, *n*, cellules à gros noyau formant la limite des acini (safranine, micro-indigo-carmin; Zeiss, obj.; oc. 6 comp.).

Figure 3. Epithélioma claveleux du poumon: la figure est constituée par de volumineux amas ou lobules épithéliaux formés de cellules atypiques (*lob*, *lob*, *lob*) séparés par de fins tractus conjonctifs qui partent de loin en loin des travées plus épaisses (*co*, *co*) mais de plus en plus dissociées par la prolifération épithéliale. Les fins tractus sont distendus de plus en plus par cette prolifération, s'usent, disparaissent par endroits de façon que les amas épithéliaux forment des nappes de plus en plus considérables (safranine, micro-indigo-carmin; Zeiss, obj.; oc. 6 comp.).



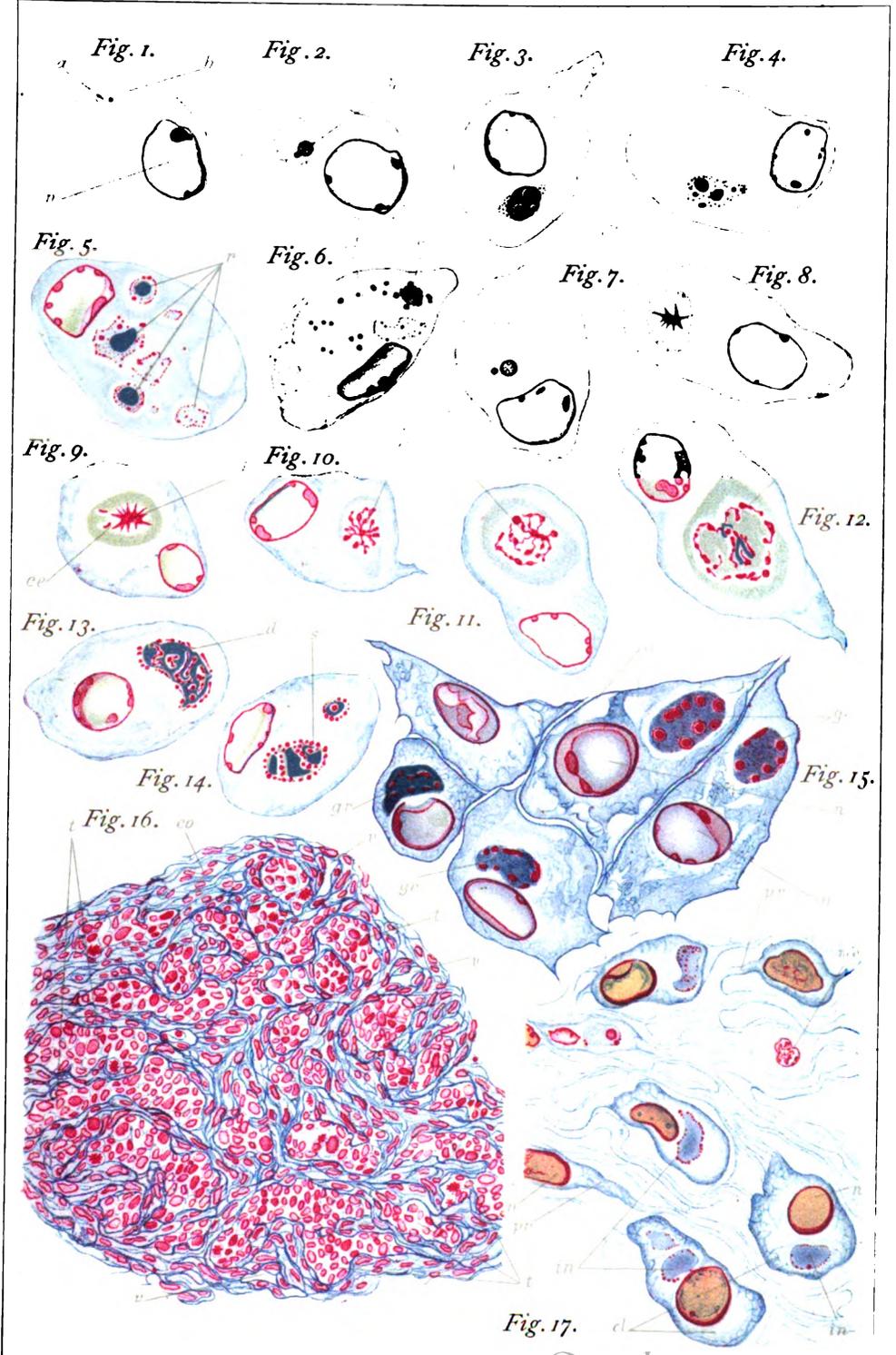


Fig. 1.

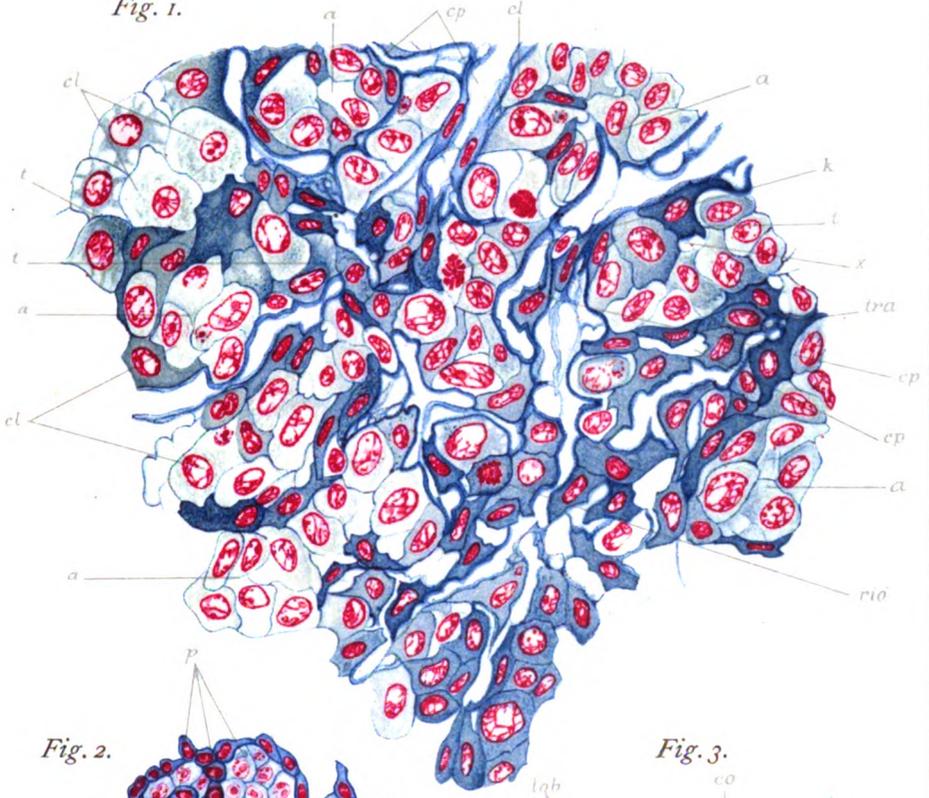


Fig. 2.

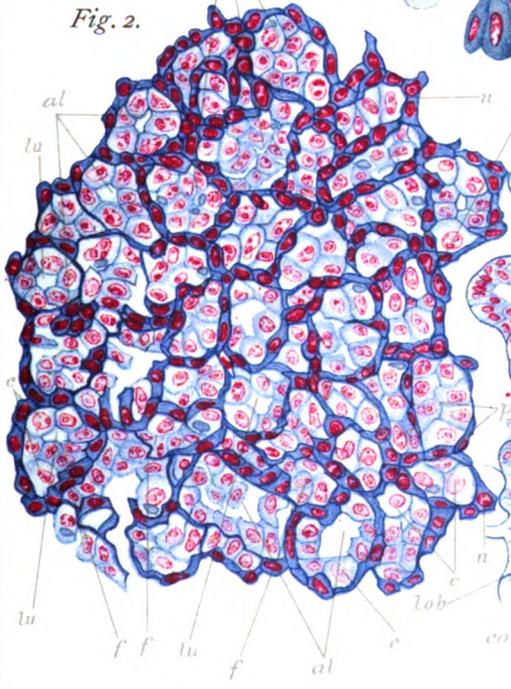
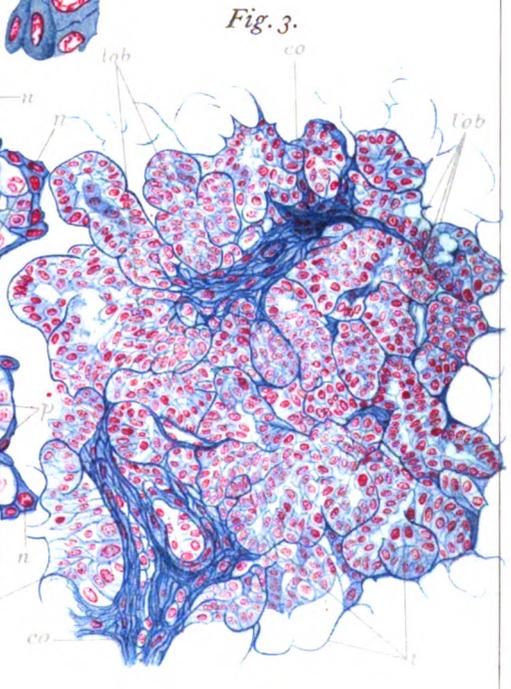


Fig. 3.



Nachdruck verboten.

Die Abschwächung der Säugetiertuberkulosebacillen im Kaltblüterorganismus.

[Aus der Untersuchungsstation des k. Garnisonlazarettes Würzburg.
Stabsarzt und Privatdozent Dr. Dieudonné.]

Von Dr. H. Herzog, k. bayr. Assistenzarzt.

Mit 1 Tafel.

(Schluß.)

Serie A.

3 Frösche wurden infiziert am 24. Oktober 1901.

(1 ccm der Emulsion tötet ein 450 g schweres Meerschweinchen in 24 Tagen an generalisierter Tuberkulose.)

I. Frosch 1 wird nach 25 Tagen getötet (19. November 1901).

Ausstrichpräparate ergeben in allen Organen Tuberkelbacillen.

Mit Leberbrei — 2 ccm der Emulsion — wird infiziert am 20. November 1901 Meerschweinchen 2; Gewicht 500 g. Tod nach 28 Tagen (18. Dezember 1901).

Starke Abdominaltuberkulose; große Milz; sämtliche Drüsen teils markig geschwellt, teils verkäst. Pericarditis aerea; Lungen frei.

II. Frosch 2 geht nach 180 Tagen ein (23. April 1902).

Ausstrichpräparate ergeben in allen Organen Tuberkelbacillen. Eine etwa kirschgroße Cyste am Rücken, mit einer rotbraunen, schmierigen Masse gefüllt, zeigt im Ausstriche ungeheure Mengen, fast Reinkulturen, von Bacillen.

Mit Leberbrei + Cysteninhalt wird infiziert am 23. April 1902

Meerschweinchen 3,	590 g Gewicht	} je 2 ccm
4,	450 " "	

Meerschweinchen 3 wird nach 100 Tagen getötet (3. August 1902). Gewicht 620 g.

Im Peritoneum parietale, hauptsächlich um die Injektionsstelle gruppiert, erbsenbis kirschgroße Knoten von weiß-gelblicher Farbe; auf dem Durchschnitt quillt dicker, gelblicher Brei hervor; Leber übersät von zahlreichen, stechnadelkopfgroßen Knötchen. Milz von gehöriger Größe, Kapsel runzelig; auf dem Durchschnitte Pulpa eingesunken, Follikel deutlich sichtbar. Nieren und Lunge ohne pathologischen Befund. In dem Brei der Knoten im Peritoneum spärliche, doch deutlich gefärbte, zum Teil in Zerfall begriffene Stäbchen durch Ausstrichpräparat nachweisbar. Drüsen leicht geschwellt.

Meerschweinchen 4 geht nach 134 Tagen ein (5. September 1902). Gewicht 530 g.

Peritonealtuberkulose wie eben beschrieben; Lebertuberkulose; große, stark verkäste Milz; sämtliche Drüsen geschwellt, zum Teil käsig eingeschmolzen; ausgedehnte Hodentuberkulose; Lungentuberkulose. Ausstrichpräparate aus Bauchfellknoten und Hodenere ergeben positiven Tuberkelbacillenbefund.

III. Frosch 3 geht nach 191 Tagen ein (4. Mai 1902).

Ausstrichpräparate aus Lymphsackgranulationen und inneren Organen ergeben positiven Tuberkelbacillenbefund.

Mit Leberbrei + Lymphsackgranulationen + Exsudat wird infiziert am 5. Mai 1902

Meerschweinchen 5,	Gewicht 270 g,	4 ccm
--------------------	----------------	-------

" 6,	" 400 "	2 "
------	---------	-----

" 7,	" 450 "	4 "
------	---------	-----

Meerschweinchen 5 geht nach 132 Tagen ein (15. September 1902). Ge-

Leber atrophisch, mit größeren und kleineren verkästen Knötchen durchsetzt. Milz vergrößert, dunkelrotbraun, mit käsigen Einlagerungen. Lungentuberkulose; Pankreas markig geschwollt. Retroperitoneal- und Bronchialdrüsen gerötet und geschwollt. Nieren ohne Befund.

Meerschweinchen 7 geht nach 192 Tagen ein (15. November 1902).
Gewicht 420 g.

Peritonealtuberkulose; Lebertuberkulose; Milz vergrößert, mit verkästen Einlagerungen. Spärliche Käseherde in den Lungen. Drüsen geschwollt bzw. verkäst.

Meerschweinchen 6 geht am 20. Februar 1903 ein (nach 291 Tagen).
Gewicht 390 g.

Geringe Peritonealtuberkulose; Milz vergrößert, mit größeren und kleineren, zum Teil stark verkästen Knoten; Lebertuberkulose; diskrete Lungentuberkulose; Drüsen geschwollt, teilweise verkäst.

No.	Tag der Infektion	Material	Dosis	Gewicht am Impftage	Gewicht nach der 8. Woche	Gewicht post mortem	Tod erfolgte nach — Tagen	Durchschnittl. Krankheitsdauer der Meerschweinchen	Zeit des Verweilens der Tuberkelbacillen im Froschkörper
2	24. Okt. 1901	Frosch 1	2 ccm	500	—	—	28	28	25
3	23. April 1902	"	2 "	450	550	530	109	117	180
4	23. " 1902	"	2 "	470	590	620	134		
5	5. Mai 1902	"	3 4	270	460	370	132	205	191
6	5. " 1902	"	3 2	400	490	390	291		
7	5. " 1902	"	3 4	450	520	420	192		

Verhalten der Tuberkelbacillen in den Froschorganen.

Frosch 1. Leber: In jedem Gesichtsfelde zahlreiche Bacillen sichtbar; sie liegen meist diffus im Gewebe, seltener in kleinen Kolonien, sehr häufig im Innern von Zellen, zuweilen in größerer Anzahl, so daß dieselben wie vollgepfropft mit Pilzen aussehen. Die Mehrzahl der Gefäße zeigt die verdickten und hyalin verbreiterten Wände mit reichlichen Bacillen besetzt. Neben gut erhaltenen, typischen Formen sieht man Pilze mit knopfförmigen Anschwellungen, teils an einem oder beiden Enden, teils in der Mitte, knieförmig gebogene oder mit seitlichen Verzweigungen versehene. Ab und zu scheinen die Pilze nur mehr aus einzelnen, aneinander gereihten Körnchen zu bestehen, wobei die sonstige Form und Größe der Tuberkelbacillen erhalten ist, oder aber sie erreichen nur die halbe, den 3. und 4. Teil der Größe der gewöhnlichen Pilze.

Frosch 2. Leber: Ueber den ganzen Schnitt zerstreut in allen Gesichtsfeldern ziemliche Mengen von Tuberkelbacillen. Sie zeigen fast ausnahmslos Zerfallerscheinungen, sind sehr klein, schmal, äußerst zart und schlank, gekörnt, nur mehr aus einzelnen Krümeln bestehend, aber deutlich gefärbt; auch in den Wandungen der Gefäße und innerhalb derselben zwischen den Blutzellen Pilze. Schön, gut erhaltene Formen finden sich nur ganz spärlich; größere Anhäufungen fehlen; die Anordnung ist eine diffuse.

Die oben erwähnte Cyste in der Rückenhaut besteht aus einem derben, bindegewebigen Mantel, daran anschließend ein tuberkulöses, zum Teil nekrotisches Granulationsgewebe. Dieses ist mit einer Unmasse von Bacillen durchsetzt. Vielfach liegen sie in großen Haufen beisammen, stark ineinander verfilzte Knoten und Zöpfe bildend — eingespritzte Kulturbröckel; andererseits erscheinen sie diffus über das

Gewebe gesät. Hier sind zahlreiche deutlich gefärbte, gut erhaltene, zierliche Stäbchen sichtbar, besonders an der Peripherie der großen Kolonien; daneben auch Pilze in allen Uebergangsstadien bis zu den bereits beschriebenen Krümel- und Körnchenformen. Die Bindegewebskapsel und die darüber liegende Rückenhaut sind bis in ihre obersten Zellschichten von Pilzen durchsetzt.

Frosch 3. Leber: Schnitte durch das Organ zeigen ganz dieselben Verhältnisse, wie eben beschrieben; nach Untersuchung zahlreicher Präparate gewinnt man den Eindruck, daß die Bakterien an Zahl geringer sind wie bei Frosch 2.

Die zum Teil mit zur Impfung benützten Granulationen aus dem Lymphsacke bestehen aus netzförmig angeordneten Bindegewebssträngen; die Maschen sind entweder leer oder mit großen epitheloiden Zellen, kleinen Rundzellen und Detritusmassen angefüllt und mit Knötchen von echtem epitheloidzelligen Bau durchsetzt. In diesem Gewebe finden sich allenthalben reichlich Tuberkelbacillen, größere zusammengesinterte Bacillennester neben vereinzelt regellos zerstreuten Pilzen. Alle möglichen Formen — gut erhaltene und deutlich gefärbte, an den Enden kolbenförmig aufgetriebene, mittel- und endständig geknöpfte, verzweigte, gegabelte Körnchenbildungen — erinnern an die im Lebergewebe gesehenen Bacillenveränderungen.

Die Untersuchung der übrigen Organe ergab dieselben Resultate: In der Milz waren durchweg die Bacillen sehr reichlich, in der Niere spärlicher und in verschiedenen Präparaten sehr verschieden an Zahl (Frosch 3); ebenso in der Lunge. Bei Frosch 1 waren in manchen Gesichtsfeldern von Lungenschnitten gar keine Tuberkelbacillen auffindbar, in anderen nur vereinzelt, dann wieder größere Ansammlungen. Schnitte durch die Magenwandung von Frosch 2 ergaben sowohl im serösen Ueberzug wie zwischen Muscularis und in der Schleimhaut überall Bacillen. Querschnitte durch den Darm von Frosch 3 zeigten in allen Schichten spärliche Anwesenheit von Pilzen.

Serie B.

8 Frösche (4—11) werden infiziert am 7. Februar 1902.

1 ccm der Emulsion tötet ein 590 g schweres Meerschweinchen nach 36 Tagen.

IV. Auf dem Transporte Würzburg-München gehen 5 Tiere am 27. Februar 1902 ein nach 20 Tagen.

Mit Leberbrei von Frosch 4 und 5 wird infiziert am 28. Februar 1902 Meerschweinchen 8, Gewicht 380 g, 2 ccm Emulsion. Tod nach 61 Tagen (30. April 1902).

Peritonealtuberkulose; Tuberkulose sämtlicher Bauchorgane; Drüsen zum Teil stark verkäst; Lungentuberkulose.

V. Frosch 6 und 7 werden nach 96 Tagen getötet (15. Mai 1902).

Mit Leberbrei werden infiziert am 15. Mai 1902

Meerschweinchen	9,	Gewicht	390 g	} je 4 ccm
"	10,	"	430 "	
"	11,	"	430 "	

Meerschweinchen 9 geht nach nach 57 Tagen ein (11. Juli 1902). Gewicht 380 g.

In der Bauchhöhle etwa 30 ccm hellgelber, seröser Flüssigkeit. Serosa parietalis mit einer ziemlichen Anzahl bis über erbsengroßer gelblicher Knötchen durchsetzt, die auf dem Durchschnitt breiige Einschmelzung zeigen. Milz vergrößert, brüchig, von käsigen Knoten durchsetzt; ebenso Leber. In den Lungen vereinzelt verkäste Herde sämtliche Drüsen affiziert.

Meerschweinchen 10 — sehr schwer krank — wird nach 63 Tagen getötet (18. Juli 1902). Gewicht 410 g.

Tuberkulose des Peritoneums und der Bauchorgane; Lunge und Nieren makroskopisch frei. Drüsen geschwellt.

Meerschweinchen 11 geht nach 95 Tagen ein (19. August 1902). Gewicht 310 g.

Kleinknotige Tuberkulose des Peritoneum parietale; Milz atrophisch, Follikel geschwellt; im Gewebe vereinzelte, etwa linsengroße Tuberkel. Leber mit kleinen Knötchen bedeckt. Nieren makroskopisch frei. Lunge zeigt einige Herde, sowie fibrinöse und fibröse Adhäsionen mit der Pleura costalis. Drüsen geschwellt.

VI. Frosch 8 wird nach 149 Tagen getötet (7. Juli 1902).

Mit Leberbrei wird infiziert am 7. Juli 1902

Meerschweinchen 12, Gewicht 570 g, 4 ccm

„ 13, „ 410 „ 3 „

„ 14, „ 680 „ 5 „

Meerschweinchen 14 geht nach 69 Tagen ein (15. September 1902). Gewicht 520 g.

Abdominaltuberkulose; Drüsentuberkulose; Lungen frei.

Meerschweinchen 13 geht nach 153 Tagen ein (8. Dezember 1902). Gewicht 450 g.

Im Peritoneum parietale ein etwa pfennigstückgroßer käsiger Herd — Injektionsstelle. Milz sehr groß, 8:4 $\frac{1}{2}$ cm, stark verkäst. Leber mit zahlreichen kleinen Knötchen durchsetzt, die zum Teil zu größeren käsigen Herden konfluieren. In der Lunge vereinzelte kleine, graue Knötchen. Drüsen teilweise verkäst.

Meerschweinchen 12 geht nach 92 Tagen ein (9. Oktober 1902).

Sektion unterblieb wegen meiner Abwesenheit von München.

No.	Tag der Infektion	Material	Dosis	Gewicht am Impftage	Gewicht nach der 8. Woche	Gewicht post mortem	Tod erfolgte nach — Tagen	Durchschnittl. Krankheitsdauer der Meerschweinchen	Zeit des Verweilens der Tuberkelbacillen im Froschkörper
8	1. März 1902	Frosch 4 u. 5	2 ccm	380	—	320	61	61	20
9	15. Mai 1902	„ 6 „	7 4 „	390	—	380	57	72	96
10	15. „ 1902	„ 6 „	7 4 „	430	—	410	63		
11	15. „ 1902	„ 6 „	7 4 „	430	520	310	95		
12	7. Juli 1902	Frosch 8	4 „	570	580	550	92	105	149
13	7. „ 1902	„ 8	3 „	410	505	450	153		
14	7. „ 1902	„ 8	5 „	680	600	520	69		

Verhalten der Tuberkelbacillen in den Froschorganen.

Frosch 4 und 5. Leber: Spärliche Anwesenheit von Bacillen, nicht in jedem Gesichtsfelde auffindbar, in anderen sehr vereinzelt. Größere Ansammlungen oder Häufchenbildungen wurden nicht gesehen. Bei Frosch 5 schienen die Pilze etwas reichlicher zu sein.

Frosch 6. Leber: In jedem Gesichtsfelde zahlreiche Bakterien, frei im Gewebe oder in Zellen eingeschlossen; auch Anhäufungen und kleine Bacillenklümpchen finden sich verschiedentlich. Ueber die Form gilt das bereits Gesagte: Typische Mikroben selten, dagegen alle möglichen Variationen, das eine Ende keulenförmig angeschwollen, das andere in kleinen Körnchen endend, durch Aufeinanderlagerung und Aneinanderreihen von mehreren Pilzen die wunderlichsten Formen bildend.

Frosch 8. Leber: Zwar in jedem Gesichtsfelde Pilze, aber nicht

so zahlreich wie bei Frosch 6. Kleine Pilzhäufchen nicht selten um vereinzelt Pigmentzellen herum. Das Gewebe ist weniger stark von Bakterien durchsetzt, doch sind sie entschieden zahlreicher wie in den von Frosch 4 und 5 erhaltenen Präparaten.

Schnitte durch die Milz von Frosch 4 und 5 ergaben einigemal reichliche Anwesenheit von Bacillen in diffuser Anordnung, dann wieder spärliche oder sehr vereinzelt. Das nämliche Verhalten zeigen Präparate von den Lungen: entweder zerstreut liegende Pilze in mäßiger Zahl, besonders zwischen den Zellen der Kapillaren, oder einige große Bakterienhaufen im Lumen derselben. In der Niere sind die Bakterien nur spärlich auffindbar, am deutlichsten noch innerhalb der Gefäße zwischen den Blutkörperchen. Ähnliches Verhalten zeigen Hoden, Niere und Lungen von Frosch 8. Dagegen in Milz (Frosch 8) wieder zahlreiche Pilze. Im Vergleiche zu diesen Befunden zeigen die Organe von Frosch 6 und 7 eine enorm große Menge von Tuberkelbacillen: Die Milz ist übersät von einer Unmenge von Mikroben, meist zu kleinen Nestern vereint, in allen beschriebenen Degenerationsstadien, ebenso sind in den Nieren neben zahlreichen, vereinzelt im Gewebe liegenden große Anhäufungen — Riesenkolonien — mitten im Gewebe, in Glomerulis oder innerhalb von Harnkanälchen. In diesen Kolonien finden sich viele gut erhaltene Formen. Auch in Lunge und Hoden reichlich Bakterien; in letzterem Organe besonders schön verzweigte und Y-förmige Formen, verfilzte und zusammengeballte Pilzklümpchen. Zwischen den Muskelfibrillen des Herzens, im Perikard und Endokard überall Tuberkelbacillen auffindbar.

Zusammenfassende Tabelle.

Frosch	Meer-schweinchen	Verweilen der Tuberkelbacillen im Kaltblüter	Dauer der Erkrankung der Meer-schweinchen	Bemerkungen
4 u. 5	8	20	61	
1	2	25	28	
1 ¹⁾	1'	60	56	getötet und gesund befunden
6 u. 7	{ 9 10 11 }	96	72	No. 11 Milz klein, atrophisch
8	{ 12 13 14 }	149	105	
2	{ 3 und 4 }	180	117	No. 3 Peritonealtuberkulose; Milz nicht vergrößert, makroskopisch ohne Einlagerungen
3	{ 5 6 7 }	191	205	

Ueberblicken wir nun die Ergebnisse unserer Untersuchungen, so ist damit neuerdings die bereits von verschiedenen Seiten angegebene Tatsache bestätigt, daß Säugetier-Tuberkelbacillen auf Kaltblüter verimpft, sich sehr lange Zeit — bis über 190 Tage — virulent erhalten können.

1) Mitgeteilt: Herzog, Zur Tuberkulose im Kaltblüterorganismus. (Centralbl. f. Bakt. u. Parasit. Bd. XXXI. 1902. p. 78.)

Die Angaben Sions scheinen mir damit in keiner Weise in Widerspruch zu stehen, sondern sie vielmehr zu stützen: „hat er ja doch noch $9\frac{1}{2}$ Monate nach der Impfung infektiöses, verhältnismäßig sehr virulentes Material aus der Inokulationsstelle erhalten“. (Versuch VII und Nachtrag.)

Weiterhin zeigt ein Blick auf die Tabellen, daß die Meerschweinchen der Infektion desto später erlagen, je länger die verimpften Säugetier-Tuberkelbacillen im Froschkörper verweilt hatten. Diese Tatsache kann auf zwei Möglichkeiten beruhen:

„entweder werden die dem Kaltblüter einverleibten Bakterien von dem Organismus allmählich vernichtet, so daß, je länger dieser Kampf gedauert hat, um so weniger Infektionsmaterial jeweils dem Warmblüter injiziert wird, und die scheinbar allmählich sich verlängernde Widerstandszeit lediglich auf einer fortgesetzten Herabminderung der eingepfropften Tuberkelbacillienmengen beruht,

oder aber die verimpften Bakterien sind sich während ihres Aufenthaltes im Kaltblüter an Zahl gleich geblieben, haben aber in ihrer Virulenz Einbuße erlitten und benötigen im Verhältnis zur Intensität dieser Schädigung entsprechend längere Zeit zur Entfaltung ihres deletären Einflusses auf den Warmblüter. In diesem Falle käme in der verschiedenen langen Krankheitsdauer der Meerschweinchen die Höhe der Virulenzeinbuße zum Ausdruck und würde einen direkten Maßstab für die schädigenden Momente bilden.“

Der Entscheid für diese beiden Möglichkeiten wäre wohl absolut sicher durch zahlenmäßiges Feststellen der Tuberkelpilze in den Schnitten zu führen, wie es Lubarsch bereits einmal versucht. Obwohl es sich damals nur um eine sehr spärliche Menge von Pilzen in den Schnitten handelte — 20,5, 2,1 und 21,5 pro Schnitt — ergab die Berechnung der Bakterienindividuen für die eingebetteten Stückchen resp. die ganze Lunge 20 000, 2100 und 10 000 Stäbchen, also ganz gewiß Bakterienmengen, welche bei genügender Virulenzfähigkeit den Tod von Meerschweinchen bewirken müssen. Eine derartige annähernd exakte Berechnung war für unsere Versuche infolge der überaus reichlichen Anzahl, sowie der eigenartigen morphologischen Veränderungen der Pilze ausgeschlossen, so daß wir uns lediglich auf ein vergleichendes Abschätzen des Bakteriengehaltes beschränken mußten, obwohl wir uns bewußt sind, daß ein solch subjektives Urteil nicht absolut einwandfrei ist.

Diese Rücksicht müßte bei einer geringen Anzahl von Schnitten mit einem spärlichen Bakteriengehalt hoch angeschlagen werden, verliert aber sehr an Bedeutung, wenn bei reichlicher Anwesenheit von Pilzen in vielen Schnitten von Tieren, die zeitlich so sehr verschiedene Versuchsdauer aufweisen — 28 bis 191 Tage — keine erhebliche Verminderung wahrzunehmen ist.

Die Leberschnitte der Serie A zeigen nun für Frosch 2 eher eine Vermehrung, bei Frosch 3, wenn keine Vermehrung, so doch sicher keine Abnahme der Pilzzahl gegenüber Frosch 1. Dazu kommt, daß mit der Leber von Frosch 2 auch der breiige Inhalt der Cyste, in welchem ganz enorme Massen von Bacillen enthalten waren, sowie bei Frosch 3 Granulationen aus dem Lymphsacke, ebenfalls mit reichlichen Bakterienestern durchwachsen, mit zur Verimpfung gelangten, so daß das Infektionsmaterial für Versuch II und III an Quantität dem für Versuch I sicher überlegen war.

Für die Serie B haben wir ähnliche, vielleicht noch deutlichere

Verhältnisse. Die Leber von Frosch 8 zeigt ganz entschieden reichlichere Anwesenheit von Bakterien als die Organe von Frosch 4 und 5, und noch weit mehr in die Augen springend ist der Vergleich der Leberschnitte der letztgenannten Tiere mit Frosch 6 und 7. Wir haben hier eine ganz auffallend überlegene Zahl von Pilzen im ganzen Organ, die sich bereits in jedem einzelnen Gesichtsfelde deutlich und klar ausspricht.

Außer der Leber wurden auch die übrigen Organe vergleichend der eingehendsten Untersuchung unterzogen. Dabei konnte niemals irgend eine Abnahme der Pilzzahl nach längerer Versuchszeit wahrgenommen werden; im Gegenteil zeigte bei Frosch 6 und 7 besonders die Milz in allen Schnitten eine so überraschende, größtenteils zu Nestern vereinte Anzahl von Bacillen, ferner auch Lungen, Hoden und Nieren eine so reichliche Durchsetzung des Gewebes mit Bakterien, daß wir im Vergleiche mit den Organbefunden von Frosch 4 und 5 von einer starken Vermehrung der Bakterien sprechen müssen.

Wenn nun die Durchschnittsdauer, innerhalb welcher der Tod der Meerschweinchen erfolgte, eine stetig aufsteigende ist, so zeigen die absoluten Zeiten, in welchen die gleichzeitig bei möglichst gleichen Vorbedingungen infizierten Tiere der Infektion unterlagen, untereinander ziemliche Differenzen, und zwar scheint sich dies um so mehr geltend zu machen, je länger die Tuberkelbacillen im einzelnen Falle den schädigenden Einflüssen des Kaltblüterorganismus ausgesetzt waren. Doch muß dabei vor allen Dingen die individuelle Disposition der Tiere in Betracht gezogen werden, der Unterschied des Alters sowie der Geschlechter — Weibchen haben während der langen Versuchsdauer zum Teil ein oder mehrmals geworfen — u. s. w. Auch ist bei Uebertragung des Impfmateri als auf die Warmblüter die Austeilung naturgemäß keine exakt gleiche, so daß wohl hierin ein weiterer Grund für geringe Unterschiede in der Dauer der Erkrankung liegen muß. Wenn wir uns aber vergegenwärtigen, daß in einem Schnitte nicht 20 Tuberkelbacillen, sondern in jedem Gesichtsfelde sich viele Hunderte von Mikroben finden, so kommen wir bei einem rechnerischen Ueberschlag der Individuenzahl in dem zur Impfung benutzten Materiale zu solch ungeheuren Summen, daß trotz der ungleichen Dosierung des Giftes größere Schwankungen in der Krankheitsdauer wohl nicht ausschließlich darauf zurückzuführen sind.

Zu weiteren Vergleichen wurde eine neuerliche Serie von Fröschen mit einer Tuberkelbacillenkultur infiziert; der Herstellung des Impfmateri als — Emulsion — sowie der Austeilung desselben wurde besondere Sorgfalt gewidmet. Die Infektion geschah wieder vom Rückenlymphraume aus.

Frosch 1 ging nach 5 Tagen, Frosch 2 nach 14 Tagen ein; Frosch 3 wurde nach 40 Tagen, Frosch 4 nach 90 Tagen, Frosch 5 nach 157 Tagen, Frosch 6 nach 173 Tagen getötet. Die Untersuchung der Organe in Schnitten ergab eine Bestätigung der bereits beschriebenen Verhältnisse.

Daß also eine Minderung der Virulenzfähigkeit von Säugetiertuberkelbacillen nach längerem Aufenthalte im Kaltblüter eintritt, scheint durch die angegebenen Impfversuche zweifellos festgestellt. Der Beweis aber, daß diese Abschwächung eine dauernde ist, die nicht schon in der nächsten Generation wieder verloren geht, läßt sich nur durch Gewinnung von abgeschwächten Reinkulturen erbringen, eine Forderung, die besonders

Lubarsch wiederholt betont hat. Zu diesem Zwecke wurden verschiedene Serien von Tieren angelegt, um aus den Organen zu verschiedenen Versuchszeiten Reinkulturen zu gewinnen. Organteile wurden zur Kontrolle in jedem einzelnen Falle in Schnitten untersucht, die ausnahmslos die wiederholt angegebenen Verhältnisse feststellen ließen. Die Organe wurden unter vollständig aseptischen Kautelen mit ausgeglühtem, noch heißem Instrumente durchschnitten, die Stücke in 1-proz. Karbollösung und zwei sterilen Wässern gewaschen und dann Ausstriche auf Glycerinagar und Heyden-Agar gemacht. Beobachtung bei Zimmertemperatur, 22° und 37°. Trotz sehr zahlreicher Versuche gelang nicht eine einzige Kultur; fast alle waren bereits am 2. Tage mit Fäulnisbakterien überwuchert. Auch Ausché und Hobbs (13) hatten bei ihren Kulturversuchen stets negative Resultate. Versuche, die Säugetier-tuberkelbacillen von Frosch auf Frosch weiter zu übertragen, um durch wiederholte Passage die Anpassung an den Kaltblüter zu erleichtern und zu festigen, wurden aufgegeben, da in 4 Fällen je 3 derartig vorbehandelte Tiere spontan innerhalb 3 Tagen eingingen. Vor kurzem hat Dieudonné (14) sehr interessante Resultate über diese Fragen bekannt gegeben. Für die Erlaubnis, dieselben hier zu verwerthen, sowie für das fortwährende rege Interesse während der Dauer meiner Untersuchungen fühle ich mich Herrn Stabsarzt, Privatdozent Dr. Dieudonné zu ganz außerordentlichem Danke verpflichtet.

„Während nach Verimpfung der Bacillen der Fischtuberkulose Frösche fast ausnahmslos, wenn auch nach längerer Zeit eingehen, wobei sich in den Organen zahlreiche Knötchen finden, bleiben diese Tiere bei Verimpfung von Säugetiertuberkelbacillen fast stets am Leben. Tötet man aber einen mit Säugetiertuberkelbacillen in den Rückenlymphsack geimpften Frosch nach 60 Tagen oder auch später, so findet man in allen Organen zahlreiche Tuberkelbacillen oft zu großen Haufen vereinigt, so daß man von einer reichlichen Vermehrung sprechen kann. Verimpft man die Leber- oder die Milzemulsion eines getöteten Frosches auf eine Anzahl neuer Frösche, so geht ein Teil derselben spontan ein, die Mehrzahl derselben bleibt am Leben. Sowohl bei den spontan eingegangenen wie bei den getöteten findet man in den Organen (Leber, Milz, Nieren) zahlreiche Knötchen mit massenhaft zum Teil krümlig zerfallenen Tuberkelbacillen. Impft man von dieser zweiten Gruppe von Fröschen wieder eine Emulsion von Leber und Milz, die nach der mikroskopischen Untersuchung zahlreiche Tuberkelbacillen enthält, auf eine dritte Reihe von Fröschen, so stirbt nunmehr die Mehrzahl der Tiere spontan nach 30–60 Tagen, ein Teil bleibt am Leben. In den Organen finden sich zahlreiche miliare Knötchen und massenhaft Tuberkelbacillen; diese haben sich aber morphologisch sehr verändert, sie sind kurz und plump und sind von den Bacillen der Fischtuberkulose in Froschorganen kaum zu unterscheiden. Züchtungsversuche ergaben nach vielen Mißerfolgen (insbesondere durch Verunreinigung) eine Kultur, die gleichfalls große Aehnlichkeit mit den Bacillen der Fischtuberkulose aufwies. Sie zeigte weniger bröckeliges Verhalten als die Säugetiertuberkelbacillen, wuchs nur bei Temperaturen von 22–30° und war nicht mehr pathogen für Meerschweinchen. Versuche, diese Kulturen allmählich wieder an Temperaturen von 30° zu gewöhnen, sind bis jetzt mißlungen. Der Säugetiertuberkelbacillus vermag sich also an den Froschkörper anzupassen und wird auch schließlich pathogen für dieses Tier. Umgekehrt nimmt die Pathogenität der Säugetiertuberkelbacillen

für das Meerschweinchen nach den Passagen durch den Froschkörper immer mehr ab.“

Ich habe schon wiederholt hervorgehoben, daß die morphologischen Veränderungen der Tuberkelbacillen in den Organen derartig hochgradige sind, daß vorerst jedem Beobachter Zweifel entstehen müssen, ob man es hier wirklich mit diesen Mikroben und deren Variationsformen zu tun hat. Wenn nun diese Bedenken durch die immer wieder auftretende Erscheinung, daß die Pilze, je länger sie im Kaltblüterorganismus verweilt haben, desto schwerere Schädigungen erfahren, durch die Ähnlichkeit dieser Formen in vielen Organen vieler Tiere, durch die Tatsache, daß nicht vorbehandelte Kontrolltiere in ihren Organen keine derartigen Mikroben enthalten u. s. w. schwinden müssen, so hat die von Dieudonné gezüchtete Reinkultur den Beweis für die Richtigkeit dieser Anschauung erbracht. Die Ähnlichkeit der Pilze der Reinkultur mit den in den Organpräparaten beschriebenen Mikroorganismen ist eine auffallende: Kurze, plumpe Stäbchen, die mitunter kokkenähnlich aussehen; fadenförmige Formen, Verzweigungen, Sprossungen etc. sieht man in der Kultur selten; bei diesen Bildungen war auch ein Zweifel, daß es sich um echte Tuberkelpilze handle, ausgeschlossen. Bedenkenregend waren gerade die kleinen, kurzen Stäbchen, die entweder vereinzelt im Gewebe liegen oder vielfach in so dicke Haufen und Nester vereint sind, daß sie schwer und nur am Rande zu analysieren waren. Bei Ausstrichpräparaten der Reinkultur erhält man die gleichen Anhäufungen, so daß die Kongruenz ohne weiteres klar ist.

Vergleicht man die Resultate Dieudonnés mit den meinigen, so ergibt sich die sehr interessante Tatsache, daß bei einmaliger Durchleitung der Säugetiertuberkelbacillen durch den Froschkörper die Virulenzfähigkeit zwar sehr bedeutend herabgemindert, daß dieselben aber nach sehr langer Zeit doch noch generelle Tuberkulose im Meerschweinchen hervorzurufen im stande sind, während nach wiederholten Passagen der Tuberkelpilze durch den Kaltblüterorganismus, deren Gesamtdauer etwa meinen längsten Versuchen entsprach, Meerschweinchen sich gegen die Infektion refraktär erwiesen.

Nachdem gerade in jüngster Zeit die Beziehungen der Säugetier- bzw. menschlichen Tuberkulose und der Rindertuberkulose vielfach Gegenstand eingehender Erörterungen waren, schien es nicht uninteressant, die Wirkung der Rindertuberkulose im Kaltblüterorganismus und umgekehrt dessen Einfluß auf diese Mikroben zu studieren.

Als Infektionsmaterial benutzte ich Organe von perlsüchtigen Kälbern; am geeignetsten erwies sich die Milz, weil hier die Tuberkelknötchen sich sehr leicht herauspräparieren lassen. Am besten nimmt man nicht zu umfangreiche, etwa gut erbsengroße Knötchen, die zentral noch keine Erweichungs- oder Einschmelzungsprozesse zeigen. Die Knötchen wurden in gleicher Weise, wie ich bereits für die Froschorgane beschrieben, zu einem möglichst homogenen Brei verrieben, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und diese Emulsion in den Rückenlymphraum der Frösche injiziert.

Durch anderweitige Inanspruchnahme ist es mir nicht möglich gewesen, die Versuche vollständig zum Abschlusse zu bringen. Nachdem aber, soviel mir bekannt, die Frage noch von keiner Seite berührt worden ist, durch geeignete Versuche jedoch auch Klärungen in der

Tuberkulosefrage zu erwarten sind, möchte ich meiner bisherigen Resultate vorläufig Erwähnung tun.

Auffallen mußte vor allem, daß im Lymphsacke — Injektionsbezirk — so gut wie keine Reaktionserscheinungen wahrzunehmen waren: In der ersten Zeit — 14 Tage, 25 Tage, 42 Tage, 50 Tage post infectionem — fand sich im Rückenlymphraume eine weißlich-gelbliche, sulzige Masse, zum Teil mit Haut und Rückenfläche Verklebungen bildend sowie stark injizierte Gefäße. Nach längerer Krankheitsdauer — 62 Tage, 90 Tage, 140 Tage, 191 Tage post infectionem — nahmen diese von der injizierten Emulsion herrührenden, sulzigen und krümeligen Gebilde an Quantität bedeutend ab, so daß der Lymphsack schließlich fast leer, von normalem Aussehen vorgefunden wurde und nichts daran erinnerte, daß derselbe einmal mit pathogenem Materiale gefüllt war.

Diesen Verhältnissen entsprechend waren auch die Organbefunde. Makroskopisch konnten niemals Einlagerungen oder Knötchenbildungen aufgefunden werden, die den Verdacht eines tuberkulösen Prozesses wachgerufen hätten. Wohl fiel durchgehends die starke Durchfeuchtung der Organe auf, in den meisten Fällen verbunden mit erheblicher Schwellung derselben, so daß beispielsweise einigemal gut kaffeebohngroße Milz beobachtet wurde; doch waren in anderen Fällen, besonders wenn die Tiere erst nach 3 Monaten getötet wurden, diese Verhältnisse nicht so ausgeprägt. Nicht selten waren die Leber und insbesondere die Milz bedeckt mit weißlichen, die Oberfläche nicht überragenden Punkten, so daß die Organe ein marmoriertes Aussehen hatten.

Mikroskopisch ließen sich auch hier die bereits mehrfach beschriebenen Knötchenbildungen, bestehend aus fixen Bindegewebszellen, Leukocyten und Pigmentzellen, finden, welche nach den bisherigen Erfahrungen lediglich das Anfangsstadium zur echten Tuberkelbildung zu sein scheinen; auch kleinzellige Infiltrate, meist rundlich, aber auch unregelmäßiger Gestalt, inmitten von gesundem Gewebe, kamen häufig zu Gesicht. Verschiedentlich, und darin ist vor allem die Niere ausgezeichnet, ließen sich nekrotische Gebiete auffinden, mitunter ausgedehnte Bezirke, in denen das Gewebe völlig kernlos, homogen, die Zellen der Harnkanälchen abgeschuppt und Detritusmassen im Lumen sichtbar waren. Ein einziges Mal wurde ein echter Epitheloidtuberkel mit starker bindegewebiger Abgrenzung aufgefunden (Milz eines Frosches, nach 42 Tagen getötet).

Die Ausstrichpräparate des Organsaftes ergaben stets positiven Bakterienbefund, und zwar meist sehr reichlichen. Ebenso ließen sich Bakterien in allen Schnitten nachweisen, zuweilen in so überraschenden Mengen, daß das ganze Organ damit überflutet erschien. In ihrem morphologischen sowie tinktoriellen Verhalten zeigen die Pilze dieselben Erscheinungen, wie ich sie für die Formen der Säugetiertuberkulose beschrieben.

Die Uebertragung des Organmaterials auf Warmblüter führt, soweit sich bis jetzt beurteilen läßt, zu denselben Resultaten wie die Impfversuche mit Säugetiertuberkulose: Trotz Einverleibung der gleichen oder sogar reichlicheren Giftmenge erliegen die Meerschweinchen der Infektion desto später, je länger die Mikroben im Froschorganismus verweilt haben.

Nach meiner Versetzung nach München habe ich die Versuche im Operationskurs für Militärärzte weitergeführt. Den Vorständen des Operationskurses, Herrn Generalarzt Dr. Helferich, sowie dessen

Fig. 1.

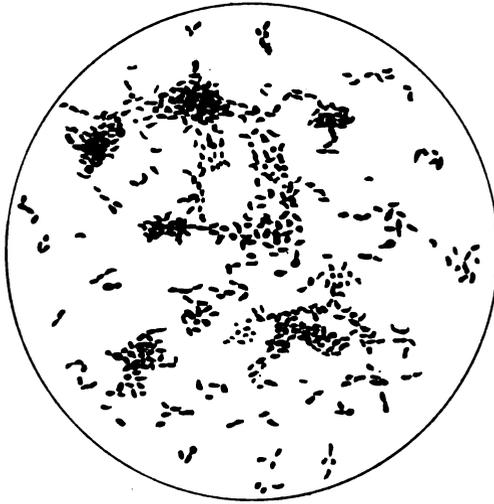
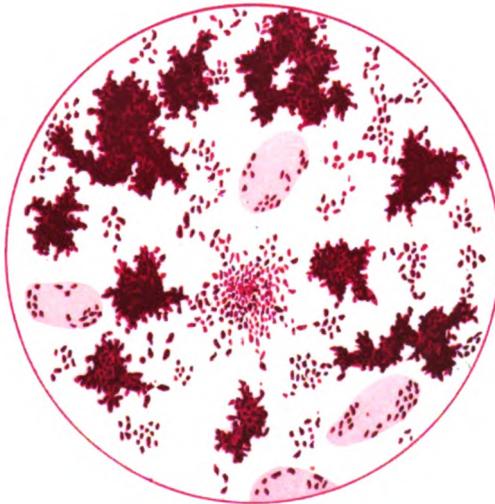


Fig. 2.



Nachfolger, Herrn Generaloberarzt Dr. Hermann, welche mir das Tiermaterial der Anstalt in entgegenkommendster Weise zur Verfügung stellten, erlaube ich mir, an dieser Stelle meinen ganz ergebensten Dank zum Ausdruck zu bringen.

Literatur.

- 1) De Pasquale, Della varietà di tubercolosi negli animali a sangue freddo. (Morgagni. 1894. Febr.)
- 2) De Michele, Ibid. 1894. No. 2.
- 3) Bataillon, Dubard et Terre, Un nouveau type de tuberculose. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1897. p. 44.)
- 4) Bataillon et Terre, La forme saprophytique de la tuberculose humaine et de la tuberculose aviaire. (Compt. rend. de l'acad. d. sc. 1897. p. 1399.)
 — —, Tuberculose et pseudo-tuberculose. (Ibid. 1898. p. 538.)
 — —, Polymorphisme du bacille de la tuberculose des poissons. (Soc. de biol. 1899. 8 juillet.)
- 5) Dubard, La tuberculose des animaux à sang froid et ses rapports avec la tuberculose des animaux à température constant. (Revue de la tubercul. Vol. II. 1898. p. 13.)
 — —, Transformations de la tuberculose humaine par la passage sur les animaux à sang froid. (Bullet. de l'acad. de méd. 1897. p. 580.)
 — —, Des modifications de la tuberculose et de son adaption à la série animale. (4. Congrès pour l'étude de la tuberculose. 1898. p. 711.)
- 6) Auché et Hobbs, Tuberculose aviaire chez la grenouille. (Soc. de biol. 1899. 21 octob.)
 — —, Non-transformation de la tuberculose humaine en tuberculose pisciaire. (Ibid.)
 — —, Evolution de la tuberculose aviaire chez la grenouille. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1899. p. 816.)
 — —, De la non-transformation en tuberculose pisciaire de la tuberculose humaine inoculée à la grenouille. (Ibid. p. 817.)
 Auché et Hobbs, De la non-multiplication du bacille tuberculeux humain ou aviaire chez la grenouille à la température ordinaire. (Ibid. p. 825.)
 — —, Etat de la virulence de la tuberculose humaine après son passage sur la grenouille. (Ibid. 1898. p. 13.)
- 7) Nicolas et Lesieur, Effets de l'ingestion de crachats tuberculeux humains chez les poissons. (Ibid. 1899. p. 774.)
- 8) Hormann u. Morgenroth, Ueber Fütterung von Fischen mit tuberkelbacillenhaltiger Nahrung. (Hyg. Rundschau. 1899. p. 857.)
- 9) Sion, Der Einfluß des Organismus kaltblütiger Tiere auf den Bacillus der menschlichen Tuberkulose. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVII. 1900. p. 710.)
- 10) Lubarsch, Zur Kenntnis der Strahlenpilze. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXI. p. 187.)
 — —, Ueber das Verhalten der Tuberkelpilze im Froschkörper. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXVIII. 1900. No. 14/15.)
- 11) Lubarsch u. Mayr, Untersuchungen über die Wirkung der Mikroorganismen der Tuberkelpilzgruppe auf den Organismus des Frosches. (Arbeiten a. d. pathol.-anat. Abt. d. kgl. hyg. Inst. Posen. 1901. p. 130.)
- 12) Herzog, Zur Tuberkulose im Kaltblüterorganismus. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXI. 1902. p. 78.)
- 13) Auché et Hobbs, De la tuberculose chez la grenouille. (Arch. de méd. expér. 1900. p. 419.)
- 14) Dieudonné, Ueber Anpassung der Säugetiertuberkelbacillen an den Kaltblüterorganismus. (Sitzungsberichte der phys.-med. Gesellsch. zu Würzburg. 1902. November.)

Nachdruck verboten.

Ueber Differenzen der Blutbeschaffenheit in verschiedenen Lebensaltern.

[Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.
Direktor: Geheimrat Professor Dr. Ehrlich.]

Von Dr. **Hans Sachs**, Assistenten am Institut.

I. Ueber die Empfindlichkeit der Erythrocyten.

In einer früheren Arbeit¹⁾ habe ich gezeigt, daß das Arachnolysin, das hämolytische Gift der Kreuzspinne, in seiner Wirksamkeit verschiedenen Blutarten gegenüber in außerordentlichem Maße schwankt, indem einzelne Blutarten, wie das Meerschweinchenblut, absolut unempfindlich sind, während andere, wie das Kaninchenblut, noch von kleinsten Giftmengen gelöst werden. Als Ursache dieser wechselnden Empfindlichkeit hatte sich Mangel, resp. Vorhandensein giftbindender Rezeptoren ergeben, und die unempfindlichen Blutzellen waren den Forderungen der Seitenkettentheorie entsprechend außer Stand das wirksame Prinzip zu binden²⁾.

Bei dieser wechselnden Verteilung der arachnolysinbindenden Rezeptoren in der Tierreihe erschien die Frage nicht ohne Interesse zu sein, ob bei den Tierarten mit giftempfindlichen Blutkörperchen das Vorhandensein der Rezeptoren in allen Altersstufen ein konstantes Merkmal darstellt, oder ob die Rezeptoren in fötalem oder juvenilem Alter noch fehlen und erst allmählich im Laufe des extrauterinen Lebens in Erscheinung treten. Die Studien, über die im folgenden berichtet werden soll, hatten außerdem noch die vergleichende Untersuchung einiger anderer Eigenschaften von Blutkörperchen und Serum erwachsener und neugeborener Tiere (resp. Föten) zum Gegenstand.

Was zunächst das Arachnolysin anlangt, so wiesen die Blutkörperchen von Rinderföten und neugeborenen Kaninchen eine mehr oder weniger geringere Empfindlichkeit auf, als diejenigen der erwachsenen Tiere; jedoch war der Unterschied eben nur ein quantitativer. Beim Huhn jedoch konnte ich eine absolute qualitative Differenz in dieser Richtung beobachten. Das Blut der eben ausgeschlüpften Hühnchen ist dem Arachnolysin gegenüber völlig unempfindlich (0,1 ccm Arachnolysin: keine Lösung), während das Arachnolysin für das Blut erwachsener Hühner ein stark wirkendes Hämolysin (0,00025 ccm: vollständige Hämolyse) darstellt. Es ist hiermit wohl zum erstenmal der Nachweis

1) Sachs H., Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes. (Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. und Pathologie. Bd. II. 1902.)

2) Daß das Arachnolysin von den Stromata der empfindlichen Blutkörperchen in der Tat nur gebunden wird, ohne für eine etwa unbemerkbare Wirkung auf das Stroma verbraucht zu werden, zeigte mir auch ein Versuch, den ich in jüngster Zeit angestellt habe. Digeriert man nämlich stark arachnolysinbeladene Stromata einer empfindlichen Blutart, die an physiologische Kochsalzlösung kein Hämolysin abgeben, mit gleichartigem nativem Blut bei 40°, so tritt Hämolyse ein. Wir haben es hier mit demselben Vorgang zu tun, den Morgenroth (Münchener med. Wochenschr. 1903. No. 2) bei ambozeptorenbeladenen Blutkörperchen beobachtet und mit dem Abbluten gewisser Farbstoffe verglichen hat. Auch hier also die nämliche Reversibilität der Rezeptorgiftverbindung, wie sie sich auch aus den die Agglutinine betreffenden Versuchen Landsteines (Münch. med. Wochenschr. 1902. No. 46) ergibt.

einer angeborenen vollständigen Zellimmunität, die im späteren Leben verschwindet, erbracht.

Eine ähnliche Beobachtung verdanken wir Camus und Gley¹⁾. Nach ihren Untersuchungen besitzen die Blutkörperchen neugeborener Kaninchen, wenn auch keine absolute Immunität, so doch eine relativ hohe Widerstandsfähigkeit gegen Aalserum und erlangen erst im Verlaufe von Wochen die normale hohe Empfindlichkeit. Auf eine nähere Analyse dieses Verhaltens sind aber Camus und Gley nicht eingegangen.

Nach den von Ehrlich entwickelten Anschauungen wird man nun annehmen dürfen, daß derartige Empfindlichkeitsunterschiede mit den die andersartigen Stoffwechelvorgänge des späteren Lebens widerspiegelnden Veränderungen des Rezeptorenapparates in engstem Zusammenhange stehen. Daß in unserem Fall der passagere Zustand der Unempfindlichkeit wirklich auf Rezeptorenmangel beruht, konnte durch den Bindungsversuch leicht erwiesen werden. Wechselnde Mengen einer Arachnolysinlösung bleiben mit je 1 ccm 5-proz. Blut vom eben ausgeschlüpften und erwachsenen Huhn (auf 2 ccm Gesamtvolumen aufgefüllt) 2 Stunden im Brutschrank. Die hämolytische Kraft der durch Abzentrifugieren der Blutkörperchen gewonnenen Abgüsse ergibt sich aus folgender Tabelle. Dabei ist zu bemerken, daß die Abgüsse nach Digestion mit dem Blute erwachsener Hühner natürlich infolge der eingetretenen Hämolyse lackfarben rot waren.

Tabelle I.

Menge des zugefügten Arachnolysins ccm	Hämolytische Wirkung der Abgüsse nach Zufügen von 0,25 ccm 20-proz. Hühnerblut (erwachsen)		C. direkte hämolytische Wirkung des Arach- nolysins auf Blut erwachsener Hühner
	A. nach Digerieren mit Blut erwachsener Hühner	B. nach Digerieren mit Blut eben aus- geschlüpfter Hühner	
0,1	komplett	komplett	komplett
0,05	"	"	"
0,025	"	"	"
0,015	"	"	"
0,01	"	"	"
0,005	stark — fast komplett	"	"
0,0025	mäßig	"	"
0,0015	wenig	fast komplett	fast komplett
0,001	Spur	stark	stark

Nach Vorbehandeln des Arachnolysins mit dem alten Blute, wie wir das Blut erwachsener Hühner der Einfachheit halber kurz nennen wollen, ist also ein beträchtlicher Verlust an hämolytischer Wirksamkeit zu bemerken, indem die komplett lösende Dosis von 0,0025 auf 0,01 ccm gestiegen ist. Die Abgüsse von dem jungen Blute haben aber, wie ein Vergleich von Kolonne B. und C. der Tabelle zeigt, ihre Wirksamkeit voll und ganz erhalten. Die unempfindlichen Blutzellen binden also auch das Gift nicht.

Weiterhin wurde durch Untersuchung des Blutes verschiedener Altersstufen ermittelt, wann die Blutkörperchen empfindlich werden, und wie das Uebergangsstadium verläuft. Es zeigte sich dabei, daß schon am 4. Lebenstage der Zustand der absoluten Resistenz nicht mehr

1) Camus, L. et Gley, E., Nouvelles recherches sur l'immunité contre le sérum d'anguille. (Annales de l'Inst. Pasteur. T. XIII. 1899.)

besteht. Indes bewirkten erst sehr große Arachnolysinmengen Hämolyse, der eine ziemlich lange Inkubationszeit voranging. Es folgt dann eine Periode, etwa vom 6. Tage ab, in der das Arachnolysin auf die Blutkörperchen in geringerem oder stärkerem Grade etwa in derselben Verdünnung hämolytisch einwirkte, wie auf die Blutkörperchen erwachsener Hühner. Charakteristisch ist aber, daß selbst bei den größten Arachnolysinmengen die Lösung nicht komplett wird, wie dies übrigens auch Camus und Gley (l. c.) bei ihren Versuchen mit Aalserum und dem Blute junger Kaninchen während der Periode der fast erreichten Empfindlichkeit erwähnen. Es bleibt also immer ein Blutkörperchenrest ungelöst, und wir werden nicht fehlgehen, wenn wir diesen Befund als Ausdruck dafür auffassen, daß die ursprünglich vorhandenen Blutkörperchen unempfindlich bleiben, und daß erst die nach dem Ausschlüpfen neugebildeten Blutkörperchen die geeigneten Rezeptoren besitzen. Das Erreichen der normalen hohen Empfindlichkeit scheint individuellen Schwankungen unterworfen zu sein. Ich habe am 14. Lebenstage bereits vollempefindliches Blut gefunden, in anderen Fällen aber noch nach 3 Wochen partielle Resistenz beobachten können. Nach Ablauf der 4. Woche scheint jedenfalls der normale Empfindlichkeitsgrad stets erreicht zu sein.

Aus diesen Vorgängen können wir also schließen, daß frühestens nach 14 Tagen, spätestens nach 4 Wochen alle ursprünglich vorhandenen Blutkörperchen verschwunden sind. Diese Feststellung dürfte für die Frage der Lebensdauer der roten Blutkörperchen von einem gewissen Interesse sein. Auch beim Menschen wären derartige Untersuchungen leicht auszuführen; es würde sich nur darum handeln, ein geeignetes Blutgift zu finden, demgegenüber die Blutkörperchen Neugeborener sich andersartig verhalten, als diejenigen Erwachsener.

Bei anderen Blutgiften habe ich wesentliche Empfindlichkeitsunterschiede der Blutkörperchen verschieden alter Tiere nicht gefunden. Erwähnt sei, daß sich die Blutkörperchen junger Tiere (Rinder- und Schweineföten, neugeborene Kaninchen und frisch ausgeschlüpfte Hühner) dem Staphylolysin gegenüber weniger resistent erwiesen, als die Blutkörperchen Erwachsener. Wir sehen also, daß auch das junge Hühnerblut dem Staphylolysin gegenüber empfindlicher ist, gegen Arachnolysin aber absolut unempfindlich. Es zeigt dies also in eklatantester Weise, daß, soweit spezifische Blutgifte in Betracht kommen, von einer Resistenz im allgemeinen nicht gesprochen werden kann. Der Begriff der Resistenz oder Empfindlichkeit deckt sich eben mit dem Fehlen oder Vorhandensein geeigneter Rezeptoren.

II. Ueber den Lecithinvorrat des Blutes.

Ein größeres Interesse dürfte vielleicht das Verhalten des Cobragiftes bei fötalem Blut beanspruchen. Nach den Untersuchungen von Flexner und Noguchi¹⁾ wirkt das Cobragift erst nach Zufügen geeigneter Komplemente hämolytisch, und Kyes²⁾ konnte im Anschluß daran feststellen, daß es neben Blutarten, die durch Cobragift an und für sich angegriffen werden, auch solche gibt, die erst nach Zufügen gewisser aktivierender Substanzen der hämolytischen Wirkung des Cobragiftes unterliegen. Als den wichtigsten Cobragiftaktivator hat Kyes

1) Flexner und Noguchi, Journal of experimental medicine. Vol. VI. 1902.

2) Kyes, Berliner klin. Wochenschr. 1902.

(l. c.) das Lecithin erkannt, und wir¹⁾ konnten gemeinsam den Nachweis führen, daß auch die Fähigkeit der direkt empfindlichen Blutarten, durch Cobragift allein gelöst zu werden, auf deren Lecithinvorrat beruht.

Als ich nun fötales Rinderblut der Wirkung des Cobragiftes aussetzte, trat Hämolyse ein, während das Blut erwachsener Rinder niemals von Cobragift gelöst wird. Ich lasse einen derartigen Versuch folgen.

Tabelle II.

Menge der zugefügten 1-proz. Cobragiftlösung ccm	Grad der Hämolyse	
	A. 1 ccm 5-proz. fötales Rinderblut	B. 1 ccm 5-proz. Rinder- blut (erwachsen)
1,0	komplett	}
0,5	"	
0,25	"	
0,1	"	
0,05	Spur	
0,025	"	
0,01	0	

Das fötale Rinderblut besitzt also eine recht beträchtliche Empfindlichkeit gegenüber dem Cobragift im Gegensatz zu der im späteren Leben zu bemerkenden vollkommenen Resistenz. Die absolute Empfindlichkeit der Blutkörperchen, d. h. die Empfindlichkeit bei optimalem Lecithinzusatz, weist aber beim Fötus und erwachsenen Rind keine Differenzen auf; wenn die nötige Menge Lecithins zur Aktivierung zugefügt wird, so ist die minimale zur kompletten Hämolyse notwendige Menge Cobragift (in dem Versuche der Tabelle II: 0,0005 cc.) in beiden Fällen die gleiche. Wir haben es also hier nicht mit einem im extrauterinen Leben eintretenden Rezeptorenverlust zu tun, sondern mit einem Mangel an dispositionsfähigem Lecithin, das während des fötalen Lebens eben in zur Cobragiftaktivierung geeigneterer Form in den roten Blutkörperchen enthalten ist. Nun habe ich früher mit Kyes (l. c.) darauf hingewiesen, daß das Lecithin in Uebereinstimmung mit den Anschauungen hervorragender Physiologen in Blutkörperchen und Serum nicht frei enthalten, sondern mit Eiweißstoffen etc. gepaart ist. Je nach der Festigkeit dieser Bindung, wird der Cobraambozeptor das Lecithin an sich reißen können. In den fötalen Blutkörperchen muß also nach unseren Befunden das Lecithin lockerer gebunden und leichter disponibel sein, als im Blute Erwachsener, was auf eine chemische Differenz des fötalen Lecithinstoffwechsels hinweist und mit der allgemein angenommenen physiologischen Bedeutung des Lecithins für die Entwicklung und das Wachstum der lebenden Organismen in bestem Einklang steht.

Bei einem älteren Rinderfötus, dessen Blut ich untersuchte, war bereits eine erhöhte Resistenz vorhanden, indem 1,0 ccm einer 1-proz. Cobragiftlösung nur unvollständige Hämolyse verursachte; die Bedingungen der Lecithinphysiologie schienen sich also schon denen des extrauterinen Lebens zu nähern.

In analoger Weise habe ich auch beim Meerschweinchenblut, das durch Cobragift an und für sich schon gelöst wird, eine 4—5mal höhere Empfindlichkeit des Blutes Neugeborener beobachtet, während auch hierbei bei genügendem Lecithinzusatz ein Ausgleich dieser Diffe-

1) Kyes, P. und Sachs, H., Berliner klin. Wochenschr. 1903. No. 2—5.

renz stattfindet. Also auch hier besteht eine höhere Disponibilität des Lecithinvorrats der Neugeborenen.

Wenn ich nun auf meine, die Eigenschaften des Blutserums betreffenden Versuche eingehen darf, so möchte ich hieran gleich anschließen, daß auch im Serum neugeborener Tiere durch den Nachweis mittels Cobragifts eine freiere Verfügbarkeit des Lecithins festgestellt werden kann. Meerschweinchenserum aktiviert Cobragift, wie die Arbeiten von Kyes und Sachs¹⁾ ergeben haben, durch eigentliche Komplemente. Für die Komplementnatur spricht namentlich die Inaktivierbarkeit des Serums durch Erhitzen auf 56°, da solche Serumarten, die disponibles Lecithin enthalten, auch nach dem Erhitzen zur Aktivierung des Cobragiftes befähigt sind²⁾.

Das Serum neugeborener Meerschweinchen aktiviert nun Cobragift schon in erheblich geringerer Menge, als das Serum erwachsener Meerschweinchen, wie folgender Versuch zeigt.

Tabelle III.

Mengen des Meerschweinchenserum ccm	1 ccm 5-proz. Ochsenblut + 0,02 ccm Cobragift 1-proz.	
	A. Serum neugeborener Meerschweinchen	B. Serum erwachsener Meerschweinchen
0,5	komplett	komplett
0,25	"	wenig
0,1	"	Spur
0,05	"	Spürchen
0,025	"	0
0,01	Spürchen	0

Daß die höhere Wirksamkeit des Serums Neugeborener in der Tat durch das Lecithin bedingt ist und nicht durch einen größeren Komplementgehalt, der ja immerhin gewissen individuellen Schwankungen unterliegen könnte, ergibt sich aufs schlagendste durch das Verhalten der inaktivierten Sera. Wurde nämlich das Serum des neugeborenen und alten Meerschweinchens $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erhitzt, so war das letztere, wie immer, seiner Wirkung beraubt, während ersteres nur einen geringen Teil seiner Wirksamkeit eingebüßt hatte.

Tabelle IV.

Dieselbe Anordnung wie in Tabelle 3; nur Meerschweinchensera $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erhitzt.

Menge des Meerschweinchenserums ccm	A.	B.
0,5	komplett	} 0
0,25	"	
0,1	"	
0,05	"	
0,025	Spur	
0,01	0	

Es zeigt also dieser Versuch, daß im Serum neugeborener Meerschweinchen neben Komplementen ein größerer Lecithinvorrat für den Cobraambozeptor disponibel ist, der im späteren Leben wohl eine festere

1) l. c.

2) Erhitzt man Sera auf 65° oder höher, so werden alle, auch Meerschweinchenserum, durch Freiwerden des Lecithins zur Aktivierung des Cobragifts befähigt (cf. Kyes l. c.)

Bindung an andere Serumbestandteile erfährt, welche die Wirkung auf Cobragift nicht mehr ermöglicht.

III. Ueber die Hämolytine und Komplemente des Serums.

Weitere Untersuchungen betrafen die vergleichende Feststellung der hämolytischen und komplettierenden Funktionen der Sera von Erwachsenen und Neugeborenen. Ueber die normalen Serumstoffe im juvenilen Alter liegen schon einige Beobachtungen vor. G. Müller¹⁾ berichtet aus dem hiesigen Institute, daß im Serum jugendlicher Tiere (Kälber) manche Bakterienagglutinine noch gar nicht oder nur in quantitativ geringer Menge vorhanden sind, während sie sich stets im Serum erwachsener Rinder vorfinden.

Was die normalen Hämolytine des Blutserums anlangt, so beobachtete Resinelli²⁾, daß das menschliche fötale Serum fremde Blutkörperchen stets in merklich geringerem Grade löst, als das Serum der Mutter. Außerdem sind eine ganze Reihe Befunde mitgeteilt worden, die auf gewisse Unterschiede im hämolytischen oder agglutinierenden Verhalten des fötalen und mütterlichen Serums hinweisen. Ich erinnere hier nur an die Arbeiten von Halban³⁾, Schumacher⁴⁾, Halban und Landsteiner⁵⁾, Langer⁶⁾ etc. Halban und Landsteiner haben ebenso, wie schon Resinelli, festgestellt, daß beim Menschen mütterliches Serum Kaninchenblutkörperchen in stärkerem Maße löst, als kindliches Serum⁷⁾. Die Frage, ob es sich hierbei um Mangel an Komplement oder Mangel an Ambozeptor handele, suchten sie dadurch zu entscheiden, daß sie dem kindlichen Serum inaktiviertes mütterliches Serum zufügten. Durch die eingetretene Verstärkung konnten sie einen Mangel an Ambozeptor im kindlichen Serum nachweisen, ohne eine etwaige Differenz des Komplementgehalts auszuschließen.

Ich selbst habe in allen daraufhin untersuchten Fällen ein vollständiges oder fast vollständiges Fehlen der normalen Hämolytine im Serum von Föten oder Neugeborenen gefunden (fötales Rinderserum — Kaninchenblut, Meerschweinchenblut; fötales Schweineserum — Kaninchenblut, Meerschweinchenblut; Serum neugeborener Meerschweinchen — Kaninchenblut), im Gegensatz zu dem Vorhandensein dieser Hämolytine im Serum Erwachsener.

Beim Rinderserum habe ich durch Zufügen inaktivierten Serums Erwachsener zum aktiven fötalen Serum die Frage des Ambozeptor- oder Komplementmangels ebenfalls zu beantworten versucht. In der Tat tritt bei dieser Kombination eine nicht unerhebliche Hämolyse ein, wie Tabelle V (p. 692) zeigt.

Es scheint also das Nichtvorhandensein der normalen hämolytischen Funktionen in der fötalen Periode in Uebereinstimmung mit den Angaben von Halban und Landsteiner im wesentlichen durch das Fehlen der Ambozeptoren verursacht zu sein. Daneben muß der Komplementgehalt aber auch ein geringerer sein; denn sonst hätte

1) Müller, G., Ueber Agglutinine normaler Tiersera. I.-D. Bern 1901.

2) Resinelli, G., Ferrara 1901.

3) Wiener klin. Wochenschr. 1900. No. 24.

4) Zeitschr. für Hygiene. Bd. XXXVII. 1901.

5) Münchner med. Wochenschr. 1902. No. 12.

6) Zeitschr. für Heilkunde. 1903, Heft 5.

7) Es sei hier erwähnt, daß im fötalen menschlichen Serum nach einer noch nicht publizierten Beobachtung des Herrn Dr. Marshall die im Serum Erwachsener stets vorhandenen Hämolytine für Meerschweinchenblut fehlen.

der Grad der Hämolyse in Kolumne B. dem in Kolumne C. nicht nachstehen dürfen.

Tabelle V.

Mengen des zugefügten aktiven Rinderserums ccm	1 ccm 5-proz. Meerschweinchenblut		
	A. fötales Rinderserum	B. fötales Rinderserum, außerdem überall 0,3 ccm inaktives Serum er- wachsener Rinder	C. Serum erwachsener Rinder
0,5	} 0	fast komplett	komplett
0,25		mäßig	
0,1		Spürchen	stark
0,05		0	Spur
0,025		0	0

Auch die Komplemente für die künstlich erzeugten Ambozeptoren können während des fötalen Lebens in wesentlich geringerer Konzentration vorhanden sein. So waren im fötalen Schweineserum die Komplemente für die Ambozeptoren einer mit Hammelblut vorbehandelten Ziege und der mit Ochsenblut vorbehandelten Kaninchen im Vergleich mit dem Verhalten des Serums erwachsener Tiere auf den 20. Teil reduziert, während das Serum neugeborener Meerschweinchen nur einen geringen Mangel an diesen Komplementen aufwies.

Die hier beschriebenen, mehr oder weniger markanten qualitativen und quantitativen Differenzen der physiologischen Funktionen von Blutkörperchen und Serum bieten in Rücksicht auf die Selbständigkeit des fötalen Stoffwechsels weitere interessante Illustrationen zu der Anschauung Ehrlichs¹⁾, „daß zwischen der Art des jeweiligen Stoffwechsels und der Art der vorhandenen Rezeptoren ein organisch harmonischer Zusammenhang besteht“.

Nachdruck verboten.

Ueber Komplementbindung durch Organzellen.

[Aus dem hygienischen Institute der deutschen Universität in Prag.
Vorstand: Prof. Dr. Hueppe.]

Von Dr. **Edmund Hoke**,

I. Assistenten der internen Klinik des Prof. R. v. Jaksch.

Die hämolytischen Eigenschaften tierischer Organe, wie sie durch Metschnikoff (1), Klein (2), Shibayama (3), Tanassevitsch (4) beschrieben worden sind, stehen mit der umgekehrten Wirkung derselben Organe, hämolytische Sera ihrer hämolytischen Kraft zu berauben, in einem schroffen Gegensatz.

v. Dungern (5) konnte zuerst zeigen, daß die verschiedensten Organe die hämolytische Fähigkeit fremden und des eigenen Serums beschränken resp. aufzuheben vermögen.

Wilde (6) bestätigt v. Dungen's Angaben und zeigt ferner, daß Aleuronat dieselbe Eigenschaft besitzt.

Dieser Gegensatz fand durch die Arbeit von Korschum und Morgenroth (7) eine Aufklärung. Diese beiden Autoren konnten nämlich zeigen, daß zwischen den Hämolysinen der Sera und den Hämolysinen, wie sie durch Organextrakte gewonnen werden, ein fundamentaler Unterschied

1) Cf. Schlußbetrachtungen in Nothnagels Handbuch der speziellen Pathologie und Therapie. Bd. VIII. 1901.

besteht, so daß es nicht angeht, die letzteren mit den ersteren ohne weiteres zu identifizieren.

Im folgenden seien Versuche mitgeteilt, die sich ebenfalls mit der Aufhebung der hämolytischen Fähigkeit normaler Sera durch Kontakt mit Organzellen desselben Tieres befassen.

Als Versuchstiere wurden Kaninchen und in einem Falle aus einem speziellen seinerzeit zu erwähnenden Grunde der Hund gewählt. Als Reagens dienten bei den Kaninchenversuchen Meerschweinchenblutkörperchen. Nur bei den Versuchen mit Hundeserum und Hundeorganen wurde Kaninchenblut verwendet.

Versuch 1.

Einem Kaninchen werden 10 ccm einer sterilen Aleuronataufschwemmung in die rechte Pleurahöhle injiziert. Nach 24 Stunden wird das Tier aus der Carotis entblutet, die Thoraxhöhle eröffnet und das in beiden Pleurahöhlen angesammelte Exsudat getrennt abpipettiert, die Pleurahöhlen dann, um den Rest der Leukocyten zu gewinnen, mit physiologischer Kochsalzlösung nachgewaschen und die Waschflüssigkeiten vereinigt. Durch Zentrifugieren konnten nun die Leukocyten aus den Exsudaten entfernt und mit den durch das Nachwaschen gewonnenen zu dem weiteren Versuche vereinigt werden. Dann wurden unter möglichst strengen aseptischen Kautelen Milz, Pankreas aselli und Knochenmark der großen Röhrenknochen entnommen, in sterilen Schalen zerrieben, und die so erhaltenen Organbreie, ferner die abzentrifugierten gewaschenen Leukocyten mit je 2—3 ccm des Serums desselben Tieres versetzt, gut durchgeschüttelt und $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° belassen. Dann wurde abzentrifugiert und das so erhaltene Serum in absteigender Menge zu je 1 ccm einer 5-proz. Meerschweinchenblutaufschwemmung zugesetzt, 1 Stunde bei 37° belassen und nach 10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 24 Stunden beobachtet. In derselben Weise wurden die zellfrei zentrifugierten Pleuraexsudate getrennt verwendet. Das Resultat des Versuches zeigt folgende Tabelle:

1) Kaninchenserum ($\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° gehalten).

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	Beginn	deutlich	komplett gelöst	komplett
0,25 "	keine Lösung	Beginn	fast komplett	"
0,1 "	" "	Spur	deutlich	"
0,05 "	" "	keine Lösung	Spur	"
0,01 "	" "	" "	keine Lösung	fast komplett

2) Leukocyterserum.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	sehr deutlich
0,25 "	" "	" "	" "	deutlich
0,1 "	" "	" "	" "	keine Lösung
0,05 "	" "	" "	" "	" "
0,01 "	" "	" "	" "	" "

3) Milzserum.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,05 "	" "	" "	" "	" "
0,01 "	" "	" "	" "	" "

4) Pankreas aselli-Serum.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,05 "	" "	" "	" "	" "
0,01 "	" "	" "	" "	" "

5) Knochenmarkserum.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,05 "	" "	" "	" "	" "
0,01 "	" "	" "	" "	" "

6) Rechtsseitiges Pleuraexsudat, zellfrei zentrifugiert.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,05 "	" "	" "	" "	" "
0,01 "	" "	" "	" "	" "

7) Linksseitiges Pleuraexsudat, zellfrei zentrifugiert.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,05 "	" "	" "	" "	" "
0,01 "	" "	" "	" "	" "

Vollkommen analog verliefen alle übrigen Kaninchenversuche, so daß ihre Ausführung nur eine Wiederholung der obigen Tabellen wäre.

Selbstverständlich trat nun die Frage auf, wodurch ist die Aufhebung der Hämolyse bedingt, durch Verschwinden des Komplementes, des Immunkörpers oder beider?

Wenn es zwar schon von vornherein höchst wahrscheinlich war, daß Bindung des Komplements eintrete, so war es doch nach Analogie mit dem Verschwinden der Bakterizidie von Serum durch Kontakt mit Organzellen denkbar, daß der Immunkörper gebunden wurde, wie dies Bail und Pettersson (8) in ihren Versuchen über Milzbrandimmunität zeigen konnten.

Um diese Frage zu entscheiden, mußte ein Komplettierungsversuch ausgeführt werden. Da es nicht gelang, ein auf den Kaninchenkörper passendes Komplement aufzufinden, wurde der Versuch mit einem Hunde wiederholt. Statt der Meerschweinchenblutkörperchen wurden jetzt, wie schon früher erwähnt, Kaninchenerythrocyten verwendet. Sonst blieb die Versuchsanordnung dieselbe.

1) Hundeserum ($\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° gehalten).

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	glatt gelöst	komplett	komplett	komplett
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	beginnt	" "	" "	" "
0,005 "	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	deutlich

2) Leukocyterserum.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,005 "	" "	" "	" "	" "

3) Milzserum.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,005 "	" "	" "	" "	" "

4) Mesenterialdrüsenserum.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,005 "	" "	" "	" "	" "

5) Knochenmarkserum.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	" "	" "	" "	" "
0,005 "	" "	" "	" "	" "

6) Rechtsseitiges Pleuraexsudat, zellfrei zentrifugiert.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	glatt gelöst	glatt gelöst	glatt gelöst	glatt gelöst
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,005 "	" "	" "	" "	" "

7) Linksseitiges Pleuraexsudat, zellfrei zentrifugiert.

Menge	nach 10 Minuten	30 Minuten	1 Stunde	24 Stunden
0,5 ccm	glatt gelöst	glatt gelöst	glatt gelöst	glatt gelöst
0,25 "	" "	" "	" "	" "
0,1 "	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung	keine Lösung
0,005 "	" "	" "	" "	" "

Ferner wurde je 1 ccm der 5-proz. Kaninchenblutaufschwemmung versetzt mit 1) Leukocytenserum 0,5 ccm + 0,75 ccm Meerschweinchenserum — glatte Lösung nach 1 Stunde, 2) mit 0,5 ccm Leukocytenserum + 0,75 ccm inaktiviertes Meerschweinchenserum — nach 24 Stunden keine Lösung, 3) mit 0,5 ccm Leukocytenserum + 0,75 ccm inaktiviertes Hundeserum (Zuführung von Immunkörpern) — keine Lösung in 24 Stunden, 4) mit 0,75 ccm aktivem Meerschweinchenserum + 0,75 ccm inaktiviertes Hundeserum — glatte Lösung in 1 Stunde.

Ebenso gelang es, das durch Knochenmark inaktiv gewordene Hundeserum durch 0,75 ccm aktives Meerschweinchenserum glatt zu reaktivieren.

Die aus den obigen Versuchsreihen zu ziehenden Schlüsse lassen sich dahin zusammenfassen, daß Organzellen desselben Tieres im stande sind, das Serum seiner hämolytischen Fähigkeit zu berauben und zwar durch Bindung seines Komplementes.

Nicht nur zertrümmerte Organzellen, sondern auch lebende Zellen, wie sie die Leukocyten darstellen, haben dieselbe Fähigkeit.

Was die wenigstens beim Kaninchen deutlich ausgesprochene behinderte hämolytische Wirkung der Pleuraexsudate betrifft, so wäre es denkbar, anzunehmen, daß diese durch den langen Kontakt mit den Leukocyten bei der hohen Körpertemperatur des Kaninchens schon im Tierkörper einen Verlust an Komplement erlitten haben.

Die Anschauung von dem Ursprung des Komplements aus Leukocyten wird nach dem Mitgetheilten schwer verständlich, wenn man bedenkt, wie makrophagenreiche Organe, wie die Milz, Komplement zu binden im stande sind.

Literatur.

- 1) Metschnikoff, Immunität bei Infektionskrankheiten. 69 p. Jena (Fischer) 1902.
- 2) Klein, Wien. klin. Wochenschr. 1901. No. 52.
- 3) Shibayama, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXX. 1901. No. 21.
- 4) Tanassevitsch, Ann. de l'Institut Pasteur. 1902.
- 5) v. Dungern, Münch. med. Wochenschr. 1900. p. 677.
- 6) Wilde, Arch. f. Hyg. Bd. XXIV. 1902.
- 7) Korschum und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1902. p. 870.
- 8) Bail u. Pettersson, Centralbl. f. Bakt. etc. I. Abt. 1903 und Prag. med. Wochenschr. Bd. XXVIII. 1903. p. 307.

Nachdruck verboten.

The adrenal gland and its active principle in their relations to cytolytins and antitoxin production¹).

[From the Laboratory of Hygiene, University of Pennsylvania.]

By **A. C. Abbott, M. D.**,
Professor of Hygiene and Bacteriology, University of Pennsylvania.

In a brief report we would present the results of an investigation in which it was desired to render the adrenal glands of the guinea pig physiologically inactive. As is well known the surgical removal of the adrenals, as well as the destruction of the glands by the injection of necrotizing chemicals, is fatal to the animals in a few hours. We therefore attempted to neutralize the function of the organs by the use of a serum presumably specifically destructive for the adrenal cells, in the hope that thereby a gradual elimination of the gland function might be obtained, and the animal would with alive.

The specific serum was obtained by immunizing rabbits with an emulsion of fresh guinea pig adrenals thoroughly ground up in a sterile mortar and suspended in 0,85 % NaCl solution. The injections were given intraperitoneally. The sera of the immune rabbits were tested after the injection of from 14 to 38 guinea pig adrenals. The effect of such a serum upon guinea pigs when injected intraperitoneally was seen within a few minutes after the injection. The symptoms were those of intense prostration accompanied by a reduction of temperature of from 1,5° C to 2° C. Death follows in from a few hours to a few days. The postmortem findings vary slightly according to the time of death, but always present a picture indicative of a rapid blood destroying process; subcutaneous edema; enlargement of the subcutaneous lymph glands, yellowish discoloration of the subcutaneous fat; enlargement and dark color of the spleen; dark chocolate color of the cortex of the kidneys; congestion with fatty degeneration of the liver. The blood presents a conspicuous thin or watery appearance.

A composite picture drawn from the microscopic examination of the

1) Read before the Association of American Physicians, May. 1903. (Published in extenso in the Journal of Medical Research. Vol. IX. No. 3. May 1903.)

organs of a number of guinea pigs treated with serum from rabbits that have been immunized against guinea pig adrenals, is the following: In marked cases microscopic examination of the blood reveals the presence of erythrocytes in all stages of disintegration and distortion. Many of them appear fused together into soft tenacious masses. Many normal erythrocytes are to be seen, but there are also many that are irregular in size and form, and many that are abnormally colored.

Microscopic examination of the liver shows congested areas surrounded by liver cells in varying stages of degeneration. No nuclear fragmentation is observed, and the changes give the impression of being due to circulatory disturbance rather than to the action of a specific toxin. It is possible that these lesions may result from the presence of agglutinative thrombi. In advanced cases diffused fatty degeneration was present.

The spleen is usually markedly congested and is often conspicuous for the presence of large phagocytes filled with the remains of erythrocytes. In two or three cases the cells of the lymph nodes of the spleen gave evidence of destructive changes, many of the nuclei being distorted and fragmented. The sections of the spleen are often marked by the presence of what is evidently masses of blood coloring matter.

The kidneys present the most striking picture. They are marked by congestion with frequently rupture of the glomerular capillaries; the epithelium of both the convoluted and the looped tubules is conspicuous for the presence of closely packed brownish granules, evidently the debris of destroyed erythrocytes. On section the adrenals are frequently found congested, though this varies. Rarely there are tiny points of hemorrhage, but definite necrosis or degeneration has not been detected in any of our animals. Evidences of cell multiplication are here and there observed, but the study of adrenals from normal animals as well as from animals dead from other causes leads us to believe that nuclear division may be commonly observed in the cells of the adrenal in health as well as in disease.

This picture so forcibly suggested blood destruction as the cause of death and of the conditions noted that a series of control experiments with the serum of rabbits immunized against the erythrocytes of the guinea pig were instituted. In this experiment guinea pigs were treated with the serum from rabbits highly immunized against guinea pig blood, and control animals were treated with the serum of normal rabbits which possesses more or less active hemolyzing power for guinea pig erythrocytes.

The results with normal rabbit serum are somewhat irregular, due no doubt to the differences in the hemolytic activity of normal rabbit serum. In general it is not necessarily fatal when injected into the living guinea pig and may often be used in large doses.

The serum from rabbits highly immunized against guinea pig erythrocytes gives, on the other hand, quite different results. These sera when highly hemolytic, are almost invariably quickly fatal to guinea pigs even in comparatively small doses. The symptoms exhibited by these animals are identical, save in degree, with those noted after the injection of the serum of a rabbit immunized against the adrenal cells.

To sum up our results in a few words, the conditions of guinea pigs after injection of the actively hemolytic serum do not differ, except in being more pronounced, from that following injection with adrenal

serum, and it is furthermore usually impossible to distinguish by either macroscopic or microscopic examination between the tissues from the two groups of animals.

Since the most pronounced and evidently fatal action of the specific adrenal serum consists in its specific hemolytic property, we next attempted to remove the hemolytic property by the absorption method. The specific adrenal serum was heated to 55—56° C for 30 minutes to destroy the hemolytic complement; mixed with an equal volume of washed guinea pig's erythrocytes; placed in an incubator for two hours, and sometimes immediately injected, sometimes left at low temperature over night. There was always marked agglutination of the red blood corpuscles. A specific adrenal serum when thus treated is without any effect whatever when injected into guinea pigs in amounts equal to the fatal dose of untreated serum. By heating the specific adrenal serum its active effects are not necessarily modified. The receptors in the serum find therefore their appropriate complement in the fluids of the guinea pig's organism. By mixing the specific adrenal serum with a fresh emulsion of guinea pig's adrenals the fatal hemolytic effects are not necessarily eliminated, death often resulting from hemolysis.

The specific adrenal serum in the test tube shows active agglutination and hemolysis for guinea pig's erythrocytes, and is also actively agglutinative for fresh infusions of the adrenal cells. By heating for 30 minutes the hemolytic action was checked, while agglutination of both blood cells and adrenal cells was unaltered. A lysis of the adrenal cells in the test tube was not certainly to be detected. The specific hemolytic serum gave naturally hemolysis and agglutination with the guinea pig's erythrocytes, but did not have the least effect upon the adrenal cell infusion.

This was the result with serum from all the rabbits immunized against guinea pig's adrenals except one, the serum of which had no effect in the test tube upon the emulsion of adrenal glands. This variation may possibly be due to the individual peculiarity of the animal. Such deviations are not unknown in experiments of this nature.

If we insist strictly that the serum of animals immunized by the injection of definite types of alien cells shall have a specific affinity for only those cells — that is to say, shall be possessed of only specific morphological affinities, then obviously the results here recorded are at variance with our accepted ideas. If, on the other hand, it be admitted that the specificity of these sera is chemical in its relations, then there can be no reasonable grounds for surprise that such sera occasionally manifest affinities not only for the cells with which the animal furnishing the serum had been treated, but for other elements of the body as well.

Our observations lead us to the same result as that reached by v. D u n g e r n (Münchener med. Woch. 1899. No. 38) and M o x t e r (Dtche med. Woch. 1900. No. 4), in their work with ciliated epithelium and with infusions of the testicle — namely, that the injection of cells other than the erythrocytes may produce a serum having specific affinities for erythrocytes as well as for the injected cells. M e t s c h n i k o f f (Annales de l'Institut Pasteur. T. XIV. 1900) and M e t a l n i k o f f (ibid. T. XIV. 1900) both maintain that v. D u n g e r n and M o x t e r are in error; that the hemolysis observed in these sera is referable to the blood unavoidably injected with the epithelial and testicular cells used in their experiments.

It seems to us very questionable, however, that the hemolysis exhibited by our specific serum is due to the small amount of blood injected with the adrenal cells, for it was often even greater than that shown in the serum of rabbits which had been purposely injected with large doses of guinea pig erythrocytes. Thus, for example, in one of our comparative tests, we found that the serum from a rabbit that had received 53 c. c. of defibrinated guinea pig's blood was twice as active as normal rabbit serum upon guinea pig's blood. The serum from adrenal rabbit B was also twice as active, while that from adrenal rabbit D was five times as active as normal rabbit serum, and yet neither of the animals injected with the adrenal cells could have received more than the merest fraction of the amount of blood injected into the rabbit which furnished the specific hemolytic serum.

We therefore conclude that the different cells of the body, even though morphologically and physiologically unlike, may possess certain chemical constituents in common, and it seems to us possible that the apparent lack of strict specificity manifested by certain of the cytolytic sera may be referable to the stimulating action of atom groups which are common to many different cells upon particular receptors likewise common to various cells for which they possess chemical affinities, the result being the overproduction in the immune animal of such receptors. In other words, morphology and function do not necessarily indicate variation in chemical composition.

We next turned our attention to a study of the effect of the definite crystallizable body which has been isolated from the adrenal glands. In these experiments rabbits were injected with varying doses of a preparation of the active principle of the gland, which we obtained through the courtesy of Prof. Abel, to whom we here express our thanks. The most impressive feature of this group of experiments is the remarkable variation of individual susceptibility to the action of the drug, for which unfortunately there is no ready explanation, but which greatly complicates such an experiment by the consequent impossibility of determining a minimum lethal dose.

Our experiments upon the adrenal gland and its principle seemed to us to warrant the following conclusions:

I. It is doubtful if repeated injections of guinea-pig adrenals into rabbits result in the elaboration of a serum having demonstrable specific affinities for the adrenal glands of the guinea-pig in situ.

II. The most conspicuous characteristic of a serum obtained by the above plan is its destructive action upon the blood of the guinea-pig. This we do not believe is referable to the small quantity of blood injected with the adrenal cells during the immunization of the rabbit.

III. If the hemolytic receptors be removed from such an „adrenal serum“ its toxic action upon the guinea-pig disappears.

IV. Rabbits exhibit more or less of tolerance to gradually ascending doses (intraperitoneal) of the active principle of the adrenal gland. This tolerance is probably not accompanied by the presence in the serum of the rabbits of substances antagonistic (antitoxic) to the adrenal active principle in vitro.

*Nachdruck verboten.***Zur Theorie der natürlichen antibakteriellen Immunität.**

[Aus dem hygienischen Institute der Universität Graz.]

Von Dr. Paul Theodor Müller,
Assistent am hygienischen Institute Graz.

(Schluß.)

I. Versuche mit Bacterium typhi abdominalis.

Taube V (Hungertier).

Vom 13. Oktober ab hungern gelassen. 13. Oktober 2 ccm Typhus-Bouillonkultur. 16. Oktober 2 ccm Bouillonkultur. 25. Oktober aus den Flügelgefäßen verbluten gelassen.

Taube VI (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Agglutination. Versuch.

Aufschwemmung von 24-stündiger Agarkultur in Bouillon. Verdünnung des Serums:
(1) = 1 : 10.

Typhus-aufschwemmung	Serummenge	Bouillon	Verdünnung	Serum V (Hunger)	Serum VI (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	1 : 5	++	+
1 "	0,2	0,8	1 : 10	++	$\frac{+}{\square}$
1 "	0,1	0,9	1 : 20	+	0
1 "	0,4 (1)	0,6	1 : 50	$\frac{+}{\square}$	0
1 "	0,2 (1)	0,8	1 : 100	0	0
1 "	0,1 (1)	0,9	1 : 200	0	0

Taube III (Hungertier).

Vom 13. Oktober ab hungern gelassen. 13. Oktober 2 ccm Typhus-Bouillonkultur. 16. Oktober 2 ccm Bouillonkultur. 24. Oktober aus den Flügelgefäßen verbluten gelassen.

Taube IV (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Agglutination. Versuch.

Aufschwemmung von 24-stündiger Agarkultur in Bouillon. Verdünnung des Serums:
(1) = 1 : 10.

Typhus-aufschwemmung	Serummenge	Bouillon	Verdünnung	Serum III (Hunger)	Serum IV (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	1 : 5	++	++
1 "	0,2	0,8	1 : 10	++	++
1 "	0,1	0,9	1 : 20	++	++
1 "	0,4 (1)	0,6	1 : 50	++	+
1 "	0,2 (1)	0,8	1 : 100	+	0
1 "	0,1 (1)	0,9	1 : 200	$\frac{+}{\square}$	0

Taube XL (Hungertier).

Hungert vom 1. März ab. 3., 5. und 7. März je 2 ccm Typhusbouillon. 10. März getötet.

Taube XL1 (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur vom *Bact. typhi* in Bouillon aufgeschwemmt. Verdünnung
(1) = 1:10, (2) = 1:100.

Typhus- auf- schwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XL (Hunger)	Serum XLI (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	++
1 "	0,2	0,8	10	++	++
1 "	0,1	0,9	20	++	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	++	++
1 "	0,6 (1)	0,4	33	++	++
1 "	0,4 (1)	0,6	50	++	++
1 "	0,2 (1)	0,8	100	++	+
1 "	0,8 (2)	0,2	250	+ (+)	0
1 "	0,6 (2)	0,4	333	+	0
1 "	0,4 (2)	0,6	500	+	0
1 "	0,2 (2)	0,8	1000	0	0

Taubе XL (Hungertier).

Hungert vom 15. Februar ab. 16. und 20. Februar je 1 ccm Typhusbouillonkultur.
25. Februar getötet.

Taubе XLI (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Typhusagarkultur in Bouillon aufgeschwemmt (sehr dichte Aufschwemmung).
Verdünnung des Serums: (1) = 1:10.

Typhus- auf- schwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XL (Hunger)	Serum XLI (Kontrolle)
1 ccm	0,6	0,4	3,3	+ (+)	+ (+)
1 "	0,5	0,5	4	+ (+)	+ (+)
1 "	0,4	0,6	5	+ (+)	+ (+)
1 "	0,3	0,7	6,6	+ (+)	+
1 "	0,2	0,8	10	+ (+)	0
1 "	0,1	0,9	20	+	0
1 "	0,8 (1)	0,2	25	0	0
1 "	0,6 (1)	0,4	33	0	0

II. Versuche mit *Bacillus pyocyaneus*.

Taubе XI (Hungertier).

Vom 27. Oktober ab hungern gelassen. 27. Oktober 1 ccm *Pyocyaneus*-Bouillon
30. Oktober 2 ccm Bouillon. 3. November aus den Flügelgefäßen verbluten gelassen.

Taubе XII (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Agglutination. Versuch.

Aufschwemmung von 24-stündiger *Pyocyaneus*-Agarkultur in Bouillon. Ver-
dünnung des Serums: (1) = 1:10.

<i>Pyocyaneus</i> - auf- schwemmung	Serummenge	Bouillon	Verdünnung	Serum XI (Hunger)	Serum XII (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	+ (+)
1 "	0,3	0,7	6,7	++	+
1 "	0,2	0,8	10	++	0
1 "	0,1	0,9	20	+	0
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	0
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

Taube XXI (Hungertier).

Hungert vom 24. November ab. 27. November 2 ccm Pyocyaneus-Bouillon.
3. Dezember gefüttert. 4. Dezember hungert weiter; 1,5 ccm Pyocyaneus-Bouillon.
5. Dezember 1 ccm. 7. Dezember verbluten gelassen.

Taube XXII (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Pyocyaneus-Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt. Serum-
verdünnung: (1) = 1:10.

Pyocyaneus- auf- schwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XXI (Hunger)	Serum XXII (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	+
1 "	0,3	0,7	6,6	++	+
1 "	0,2	0,8	10	++	0
1 "	0,1	0,9	20	++	0
1 "	0,8 (1)	0,2	25	++	0
1 "	0,6 (1)	0,4	33	+	0
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	0
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

Taube XIII (Hungertier).

Vom 27. Oktober ab hungern gelassen. 27. Oktober 1 ccm Pyocyaneus-Bouillon.
30. Oktober 2 ccm Bouillonkultur. 4. November verbluten gelassen.

Taube XIV (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Agglutination.

Versuch.

Aufschwemmung einer 24-stündigen Pyocyaneus-Agarkultur in Bouillon. Serum-
verdünnung: (1) = 1:10.

Pyocyaneus- auf- schwemmung	Serummenge	Bouillon	Verdünnung	Serum XIII (Hunger)	Serum XIV (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	+
1 "	0,3	0,7	6,7	++	+
1 "	0,2	0,8	10	+	0
1 "	0,1	0,9	20	0	0
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	0
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

Taube XLII (Hungertier).

Hungert vom 1. März ab; 3., 5. und 7. März je 2 ccm Pyocyaneus-Bouillon.
11. März getötet.

Taube XLIII (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Pyocyaneus-Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt.

Pyocyaneus- auf- schwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XLII (Hunger)	Serum XLIII (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	+ (+)
1 "	0,2	0,8	10	++	+
1 "	0,1	0,9	20	+ (+)	(+)
1 "	0,8 (1)	0,2	25	+ (+)	0
1 "	0,6 (1)	0,4	33	+ (+)	0
1 "	0,4 (1)	0,6	50	+	0
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

Taube LXV (Hungertier).

Hungert vom 22. März ab. 24. und 26. März je 2 ccm erwärmer Pyocyaneus-
Bouillon. 30. März 2 ccm lebender Kultur. 2. April getötet.

Taubе LXVI (Kontrolltier). Wie oben.

Versuch.

48-stündige *Pyocyaneus*-Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt.

Pyocyaneus-aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum LXV (Hunger)	Serum LXVI (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	++
1 "	0,2	0,8	10	++	++
1 "	0,1	0,9	20	+	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	0	++
1 "	0,6 (1)	0,4	33	0	++
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	+
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

Taubе LXVII (Hungertier).

Hungert vom 29. März ab. 2. und 4. April je 15 ccm *Pyocyaneus*-Bouillon. 8. April getötet.

Taubе LXVIII und LXIX (Kontrolltiere). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige *Pyocyaneus*-Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt.

Pyocyaneus-aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Ser. LXVII (Hunger)	Ser. LXVIII (Kontrolle)	Ser. LXIX (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	+	+ (+)
1 "	0,3	0,7	6,6	++	0	0+
1 "	0,2	0,8	10	++	0	0
1 "	0,1	0,9	20	++	0	0
1 "	0,8 (1)	0,2	25	+	0	0

III. Versuche mit *Bacillus dysenteriae* (Kruse).

Taubе XXXVIII (Hungertier).

Hungert vom 15. Februar ab. 16. und 20. Februar je 2 ccm Dysenteriebouillon. Getötet: 25. Februar.

Taubе XXXIX (Kontrolle). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Dysenterieagarkultur, in Bouillon aufgeschwemmt. Verdünnung des Serums (1) = 1:10, (2) = 1:100.

Dysenterie-aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Ser. XXXVIII (Hunger)	Serum XXXIX (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	++
1 "	0,2	0,8	10	++	++
1 "	0,1	0,9	20	++	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	+ (+)	+ (+)
1 "	0,6 (1)	0,4	33	+ (+)	+ (+)
1 "	0,4 (1)	0,6	50	(+)	+ (+)
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0+	+
1 "	0,8 (2)	0,2	250	0	+
1 "	0,6 (2)	0,4	333	0	+
1 "	0,4 (2)	0,6	500	0	+
1 "	0,2 (2)	0,8	1000	0	(+)

Taubе XXXVI (Hungertier).

Hungert vom 12. Februar ab. 14. und 20. Februar je 2 ccm Dysenteriebouillon.

Taube XXXVII (Kontrolle). Wie oben, nur gefüttert. Beide am 23. Februar getötet.
Versuch.

24-stündige Dysenterieagarkultur in Bouillon aufgeschwemmt. Verdünnung des Serums
(1) = 1:10.

Dysenterie- aufschwem- mung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XXXVI (Hunger)	Serum XXXVII (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	+	++
1 "	0,2	0,8	10	+	++
1 "	0,1	0,9	20	(+)	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	+0	+ (+)
1 "	0,6 (1)	0,4	33	+0	+ (+)
1 "	0,4 (1)	0,6	50	(+0)	+

Taube XXVI (Hungertier).

Hungert vom 21. Dezember ab. 23. und 26. Dezember je 2 ccm Aufschwemmung
von Bac. dysenter. Kruse, auf 70° erwärmt. Geschlachtet am 4. Januar.

Taube XXVII (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.
Versuch.

24-stündige Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt, Serumverdünnung (1) = 1:10.

Dysenterie- aufschwem- mung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XXVI (Hunger)	Serum XXVII (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	++
1 "	0,2	0,8	10	+ (+)	++
1 "	0,1	0,9	20	+	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	0	++
1 "	0,6 (1)	0,4	33	0	++
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	++
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	±

Taube XVII (Hungertier).

Vom 27. Oktober ab hungern gelassen. 27. Oktober 1 ccm Dysenteriebouillon.
30. Oktober 2 ccm. 4. November verbluten gelassen.

Taube XVIII (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.
Versuch.

24-stündige Agarkultur vom Dysenteriebacillus in Bouillon. Serumverdünnung (1) =
10-fach. (2) = 100-fach.

Dysenterie- aufschwem- mung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XVII (Hunger)	Serum XVIII (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	++
1 "	0,2	0,8	10	++	++
1 "	0,1	0,9	20	++	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	+	++
1 "	0,6 (1)	0,4	30	±	++
1 "	0,4 (1)	0,6	50	±	++
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	++
1 "	0,1 (1)	0,9	200	0	+
1 "	0,8 (2)	0,2	250	0	0

Taube XXVIII (Hungertier).

Hungert vom 21. Dezember ab. 23. und 27. Dezember je 1½ ccm Aufschwem-
mung von Bac. dysent. Kruse. 4. Januar geschlachtet.

Taube XXIX (Kontrolle). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt. Verdünnung (1) = 1:10.

Dysenterie-aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XXVIII (Hunger)	Serum XXIX (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	+	++
1 "	0,3	0,7	6,6	+	++
1 "	0,2	0,8	10	0	+
1 "	0,1	0,9	20	0	+
1 "	0,8 (1)	0,2	25	0	0
1 "	0,6 (1)	0,4	33	0	0

Taube XIX (Hungertier).

Vom 10. November ab hungern gelassen. 12. November 2 ccm Dysenteriebouillon. 14. November 2 ccm, 18. November 1 ccm. 21. November Verbluten gelassen.

Taube XX (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst genau wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur von B. dysenter. in Bouillon aufgeschwemmt. Serumverdünnung (1) = 1:10.

Dysenterie-aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XIX (Hunger)	Serum XX (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	+
1 "	0,2	0,8	10	++	+
1 "	0,1	0,9	20	++	0
1 "	0,8 (1)	0,2	25	+ (+)	0
1 "	0,6 (1)	0,4	33	+	0
1 "	0,4 (1)	0,6	50	+	0
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

IV. Versuche mit Vibrio Metschnikoff.

Taube XLIV (Hungertier).

Hungert vom 7. März ab. 9., 12. und 14. März je 2 ccm durch Erwärmen abgetötete Metschnikoff-Bouillon. 16. März getötet.

Taube XLV (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur von Vibrio Metschnikoff in Bouillon aufgeschwemmt. Verdünnung (1) = 1:10.

Metschnikoff-Aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XLIV (Hunger)	Serum XLV (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	+ (+)	++
1 "	0,3	0,7	6,6	+	++
1 "	0,2	0,8	10	+	+ (+)
1 "	0,1	0,9	20	+	+ (+)
1 "	0,8 (1)	0,2	25	(+)	+ (+)
1 "	0,6 (1)	0,4	33	(+)	+
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	+
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	+

Taube XV (Hungertier).

Vom 18. November ab hungern gelassen. 22. November 2 ccm Metschnikoff-Bouillon. 24. November und 1. Dezember 1,5 ccm; bekommt zu fressen. 2. Dezember hungert weiter; 2 ccm M. 4. Dezember verbluten gelassen.

Taube XVI (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt.

Metschnikoff-Aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XV (Hunger)	Serum XVI (Kontrolle)
1 ccm	0,8	0,2	2,5	+	++
1 "	0,7	0,3	2,8	+	+(+)
1 "	0,6	0,4	3,3	0	+
1 "	0,5	0,5	4,0	0	+
1 "	0,4	0,6	5,0	0	+
1 "	0,3	0,7	6,6	0	0
1 "	0,2	0,8	10,0	0	0
1 "	0,1	0,9	20,0	0	0

Taube XXIII (Hungertier).

Hungert vom 17. Dezember ab. 19., 23. und 26. Dezember je 2 ccm Metschnikoff-Bouillon, 5 Minuten auf 70° erwärmt, intraperitoneal; 30. Dezember getötet.

Taube XXIV und XXV (Kontrolltiere). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt.

Metschnikoff-Aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XXIII (Hunger)	Serum XXIV (Kontrolle)	Serum XXV (Kontrolle)
1 ccm	0,8	0,2	2,5	++	++	++
1 "	0,6	0,4	3,3	+	++	++
1 "	0,4	0,6	5,0	+	++	++
1 "	0,2	0,8	10,0	0	+	+
1 "	0,1	0,9	20,0	0	±	±

Taube XLVI (Hungertier).

Hungert vom 7. März ab. 9., 12. und 14. März je 2 ccm abgetöteter Metschnikoff-Bouillon. 17. März getötet.

Taube XLVII (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt. Verdünnung (1) = 1:10.

Metschnikoff-Aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XLVI (Hunger)	Serum XLVII (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	+(+)	++
1 "	0,3	0,7	6,6	+	++
1 "	0,2	0,8	10	+	++
1 "	0,1	0,9	20	0+	+
1 "	0,8 (1)	0,2	25	0	+
1 "	0,6 (1)	0,4	33	0	+
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	+
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	+

Taube XXX (Hungertier).

Hungert vom 10. Januar ab. 13., 15. und 18. Januar je 1 ccm Metschnikoff-Bouillonkultur injiziert. 22. Januar geschlachtet.

Taube XXXI (Kontrolle). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt.

Metschnikoff-Aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XXX (Hunger)	Serum XXXI (Kontrolle)
1 ccm	0,6	0,4	3,3	++	+
1 "	0,4	0,6	5,0	++	+
1 "	0,2	0,8	10,0	+	0
1 "	0,1	0,9	20,0	0	0

Taube LX (Hungertier).

Hungert vom 10. März ab. 13., 15. und 17. März je 2 ccm abgetöteter Metschnikoff-Bouillonkultur. 20. März getötet.

Taube LXI (Kontrolltier). Wie oben, nur gefüttert.

Versuch.

24-stündige Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt.

Metschnikoff-Aufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum LX (Hunger)	Serum LXI (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	++
1 "	0,2	0,8	10	++	++
1 "	0,1	0,9	20	++	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	+	+
1 "	0,6 (1)	0,4	33	+	+
1 "	0,4 (1)	0,6	50	+	+
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

V. Versuche mit *Bacillus proteus vulgaris*.

Taube XXXII (Hungertier).

Hungert seit 12. Februar. 14. Februar 2 ccm Proteusbouillon. Ebenso 18. und 20. Februar. Getötet 23. Februar. Genau gleich: Taube XXXII.

Tauben XXXIV und XXXV (Kontrolltiere). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Proteusagarkultur in Bouillon aufgeschwemmt. Verdünnung des Serums (1) = 1:10.

Proteusaufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Ser. XXXII (Hunger)	Ser. XXXIII (Hunger)	Ser. XXXIV (Kontrolle)	Ser. XXXV (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	+	0+	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	+	0+	++	++
1 "	0,2	0,8	10	(+)	0	++	++
1 "	0,1	0,9	20	(+)	0	++	+(+)
1 "	0,8 (1)	0,2	25	(+)	0	++	+(+)
1 "	0,6 (1)	0,4	33	(+)	0	++	+(+)
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	0	++	+(+)

Taube XLVIII (Hungertier).

Hungert vom 10. März ab. 13. und 15. März je 2 ccm Proteusbouillonkultur. 20. März getötet.

Taub e XLIX (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

48-stündige Proteusagarkultur in Bouillon aufgeschwemmt. Serumverdünnung (1) = 1:10.

Proteusaufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XLVIII (Hunger)	Serum XLIX (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	++
1 "	0,2	0,8	10	++	++
1 "	0,1	0,9	20	+	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	0	++
1 "	0,6 (1)	0,4	33	0	++
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	+
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

Taub e XLIII (Hungertier).

Hungert vom 17. März ab. 19. und 21. März 2 ccm Proteusbouillon. 23. März schwach; etwas gefüttert, ebenso 25. und 26. März. 27. März getötet.

Taub e XLIV (Kontrolltier). Wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur von Proteus in Bouillon aufgeschwemmt. Verdünnung des Serums (1) = 1:10, (2) = 1:100.

Proteusaufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum XLIII (Hunger)	Serum XLIV (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	++	++
1 "	0,2	0,8	10	++	++
1 "	0,1	0,9	20	++	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	++	++
1 "	0,6 (1)	0,4	33	++	++
1 "	0,4 (1)	0,6	50	++	++
1 "	0,2 (1)	0,8	100	++	++
1 "	0,8 (2)	0,2	250	+(+)	+
1 "	0,6 (2)	0,4	333	+	(+)
1 "	0,4 (2)	0,6	500	0	0
1 "	0,2 (2)	0,8	1000	0	0

Taub e LXXII (Hungertier).

Hungert vom 29. März ab. 2. und 4. April je 2 ccm Proteusbouillon injiziert. 8. April getötet.

Taub e LXXIII (Kontrolltier). Gefüttert. Sonst wie oben.

Versuch.

24-stündige Agarkultur in Bouillon aufgeschwemmt.

Proteusaufschwemmung	Serum	Bouillon	Verdünnung	Serum LXXII (Hunger)	Serum LXXIII (Kontrolle)
1 ccm	0,4	0,6	5	++	++
1 "	0,3	0,7	6,6	+	++
1 "	0,2	0,8	10	0	++
1 "	0,1	0,9	20	0	++
1 "	0,8 (1)	0,2	25	0	++
1 "	0,6 (1)	0,4	33	0	+
1 "	0,4 (1)	0,6	50	0	0
1 "	0,2 (1)	0,8	100	0	0

Tabelle I.
Zusammenstellung sämtlicher Versuchsergebnisse.

	Typhus	Pyocyaneus	Dysenterie	Metschnikoff	Proteus
1	H > C	H > C	H < C	H < C	H < C
2	H > C	H > C	H < C	H < C	H < C
3	H > C	H > C	H < C	H < C	H < C
4	H > C	H > C	H < C	H < C	H = C
5		H < C	H < C	H > C	H < C
6		H > C	H > C	H = C	

H > C bedeutet, daß die agglutinierende Kraft des Serums beim Hungertier (H) größer war als beim Kontrolltier (C). H < C bedeutet, daß sie kleiner war.

Ueberblicken wir nun unsere gesamten Versuchsergebnisse, die sich in Tabelle I in wesentlich vereinfachter Form und übersichtlicher zusammengestellt finden, so bemerken wir zunächst, daß in der Tat ziemlich konstante Unterschiede zwischen den Hungertieren und den normalen Kontrollen in Bezug auf den Agglutiningehalt ihres Serums bestehen. Es hat also zweifellos die durch das Hungernlassen der Tiere gesetzte Stoffwechselstörung einen deutlichen Einfluß auf die Produktion der Agglutinine ausgeübt¹⁾. Die Differenzen zwischen den zusammengehörigen Versuchstieren sind natürlicherweise, je nach Individualität, Menge der einverleibten Bakterienkulturen u. s. w. recht verschieden groß; im allgemeinen jedoch, wie man aus der Betrachtung der detaillierten Protokolle entnehmen kann, durchaus nicht unbedeutend. Nicht selten findet sich z. B. bei dem einen Tiere ein doppelt bis dreimal so hoher Agglutinationstiter, als bei dem dazugehörigen derselben Versuchreihe. Hiermit wäre also die zu Beginn dieses Abschnittes aufgeworfene Frage nach dem Einflusse der resistenzverändernden Schädlichkeiten auf die Antikörperproduktion bis zu einem gewissen Grade erledigt und, wenigstens was die Agglutinine betrifft, bejahend zu beantworten.

1) Daß die Ergebnisse keine absolut konstanten sind, sondern sich stets auch Tiere finden, die abweichend reagieren, kann wohl bei den stets vorhandenen individuellen Differenzen nicht wunder nehmen. Wir haben es eben hier nicht mit einer chemischen, sondern mit einer biologischen Reaktion zu tun. Hervorgehoben muß übrigens werden, daß derartige abweichende Resultate nicht immer durch eine abnorme Reaktion des Tieres auf Nahrungsentziehung bedingt sein müssen. Denn da wir die Agglutininproduktion im normalen und im Hungerzustande nicht an einem und demselben Individuum vergleichen können, sondern stets 2 verschiedene Tiere benutzen, so kann ganz leicht der Fall eintreten, daß das eine derselben auch bei Nahrungsaufnahme von vornherein ungewöhnlich stark oder schwach auf die Einverleibung der Bakterienkulturen reagiert. Auch wenn dann die unter dem Einflusse des Hungers eintretende Veränderung der Agglutininproduktion in vollkommen normaler Richtung liegt, kann dann der Vergleich mit dem Kontrolltier ein abnormes Verhalten vortäuschen, indem die Wirkung des Hungers durch die individuelle Differenz gegenüber dem Vergleichstier überkompensiert wird.

Vorteilhaft dürfte es ferner sein, Tiere, die im Verlaufe der Immunisierung besonders schwere Krankheitserscheinungen aufweisen, von vornherein auszuschließen, da ich wiederholt bei solchen Tieren nur sehr geringe oder vollkommen ausbleibende Agglutininproduktion konstatieren konnte.

Die Abweichungen von der normalen Reaktionsrichtung betragen bei diesen Versuchen 11 Proz., also ca. $\frac{1}{10}$ der gesamten Experimente. Rechnet man auch diejenigen (oben nicht besonders mitgeteilten) Versuche mit ein, welche wegen mißglückter Injektion oder schwerer Erkrankung der Versuchstiere etc. ausgeschlossen wurden, so stellte sich die Zahl der Abweichung von der Norm etwas höher und betrug 21 Proz. oder etwa $\frac{1}{5}$ aller Versuche, eine noch immer relativ geringe Zahl.

Vergleichen wir nun aber die verschiedenen vertikalen Stäbe der Tabelle I, welche den Versuchen mit den verschiedenen Bakterienarten entsprechen, untereinander, so fällt sofort auf, daß die Differenzen zwischen den Hungertauben und Kontrolltauben und Kontrolltauben je nach der Art der zur Immunisierung benutzten Mikroorganismen eine verschiedene Richtung zeigen. Während zum Beispiel bei Injektion von *Bact. typhi* abdomin. und von *Bac. pyocyaneus* die Hungertiere stets einen höheren Agglutiningehalt in ihrem Serum aufwiesen, als die Kontrolltiere, war dies Verhältnis bei den Versuchen mit den anderen drei Bakterienarten: *Bac. dysenteriae*, *Vibrio Metschnikoff* und *Bac. proteus*, gerade das umgekehrte. Hier war der Agglutinationstiter des normalen Serums stets oder fast stets der höhere¹⁾.

Dieses Ergebnis ist zweifellos von großem Interesse. A priori hätte man wohl mit einem gewissen Anscheine von Berechtigung erwarten können, daß der durch längeres Hungern geschädigte und geschwächte Organismus in der Agglutininproduktion hinter dem normalen zurückbleiben würde. Demgegenüber lehren unsere Versuche von neuem, wie gefährlich es ist, zu schematisieren, und wie relativ der Begriff der Schädigung (in unserem Falle der durch die Nahrungsentziehung bedingten) zu fassen ist. Während, wie wir gesehen haben, gewissen Bakterienarten gegenüber, d. h. gewissen chemischen Substanzen gegenüber, die Fähigkeit des Organismus, Agglutinine zu produzieren, in der Tat vermindert, also „geschädigt“ erscheint, ist diese Fähigkeit anderen Mikroorganismen gegenüber sogar erhöht. Wir müssen daher wohl den Einfluß derartiger Eingriffe, wie der Nahrungsentziehung, in eine große Zahl von Einzelkomponenten zerlegen, welche Vermehrung der Zellleistung in der einen, Verminderung in der anderen Richtung bedingen, eventuell neben diesen quantitativen auch qualitative Abweichungen der Zellentätigkeit von der Norm hervorrufen. Ob aber die Gesamtheit dieser unter dem Einflusse des Hungers eintretenden Veränderungen dabei eine Schädigung oder eine Förderung des Organismus, eine Vermehrung oder Verminderung seiner Widerstandsfähigkeit bedeutet, das läßt sich im einzelnen durchaus nicht immer überblicken und vorhersagen und hängt einerseits von der Resultierenden aller dieser eingetretenen Modifikationen der Zellfunktion, andererseits von der Beschaffenheit jener Schädlichkeiten ab, welchen gegenüber die Widerstandsfähigkeit des durch Hunger oder andere Einwirkungen alterierten Organismus erprobt wird. Natürlich soll damit der Einfluß des allgemeinen Kräftezustandes in seiner Bedeutung durchaus nicht geschmälert werden. Von diesem Gesichtspunkte aus erscheint es daher ganz gut denkbar, daß ein Eingriff, welcher die Resistenz gewissen Schädlichkeiten gegenüber herabsetzt, dieselbe anderen Agentien gegenüber wesentlich erhöht, und so wird denn die interessante und scheinbar paradoxe Beobachtung von Teissier und Guinard (23) unserem Verständnisse nähergerückt, nach welcher Hunde durch längeres Hungernlassen erheblich widerstandsfähiger gegen die Vergiftung mit

1) Es läßt sich vermuten, daß es noch eine dritte, zwischen diesen beide stehende Gruppe von Mikroorganismen gibt, welchen gegenüber die Agglutininproduktion unter dem Einflusse des Hungers weder vermehrt noch vermindert wird, also keine Veränderung erleidet.

den Toxinen des Diphtheriebacillus und des *Bac. pneumoniae* gemacht werden können.

Es muß besonders betont werden, daß die von uns bei unseren Versuchen beobachtete Steigerung bzw. Hemmung der Agglutininproduktion durch den Hunger nicht mit einer gleichsinnigen Aenderung der Resistenz identifiziert werden darf. Denn ebenso wie der hungernde Organismus auf die Einverleibung der Proteine und Toxine verschiedener Bakterienarten verschieden reagiert, und die eine mit vermehrter, die andere mit verminderter Antikörperproduktion beantwortet, so muß derselbe sich zweifellos auch den verschiedenen Leibesbestandteilen und Stoffwechselprodukten einer und derselben Bakterienart gegenüber verschieden verhalten, und es kann daher ganz gut der Fall eintreten, daß die Bildung der Schutzstoffe unter dem Einflusse des Hungers gehemmt erscheint, während die Agglutininproduktion gleichzeitig eine bedeutende Vermehrung aufweist. Daß in der Tat diese beiden Funktionen voneinander bis zu einem gewissen Grade unabhängig sind, haben ja die Beobachtungen zahlreicher Forscher an normalen (nicht durch Hunger geschädigten) Tieren zur Genüge erwiesen¹⁾.

Wie berechtigt übrigens und wie notwendig eine derartige Zurückhaltung in der Verallgemeinerung der Schlußfolgerungen ist, konnte ich gerade bei diesen meinen Versuchen sehr deutlich gewahr werden. Wie aus den Protokollen hervorgeht, gehört der Typhusbacillus zu jener Gruppe von Mikroorganismen, welche im hungernden Tiere eine stärkere Agglutininbildung auslöste, als im normalen Kontrolltiere. Andererseits hatte ich gerade bei dieser Bakterienart die größte Zahl von Verlusten an Versuchstieren zu beklagen, und zwar waren es, wie Tabelle II zeigt, fast stets die Hungertiere, welche eingingen: nur ein einziges Mal unter 5 derartigen — natürlich für die vergleichende Agglutininbestimmung unbrauchbar gewordenen — Versuchsreihen war, neben der Hungertaube, auch die Kontrolltaube eingegangen. Es scheint also, daß die unter dem Einflusse des Hungers eintretende Vermehrung der Agglutininbildung nicht mit einer Steigerung der Resistenz gegenüber dem Typhusbacillus und seinen Stoffwechselprodukten Hand in Hand ging.

Tabelle II.

Hungertaube L.	Kontrolltaube LI.
Hungert vom 12. Februar ab	14. Februar 2 ccm Typhusbouillonkultur
14. Februar 2 ccm Typhusbouillonkultur	16. „ lebt, munter
16. „ †	
Hungertaube LII.	Kontrolltaube LIII.
Hungert vom 12. Februar ab	14. Februar 2 ccm Typhusbouillon
14. Februar 2 ccm Typhusbouillonkultur	17. „ munter
16. „ krank	
17. „ †	
Hungertaube LIV.	Kontrolltaube LV.
Hungert vom 15. Februar ab	16. Februar 1 ccm Typhusbouillonkultur
16. Februar 1 ccm Typhusbouillon	20. „ 2 „ „
20. „ 2 „ „	25. „ † „ „
24. „ †	

1) Vor kurzem hat z. B. L. Deutsch gelegentlich des Studiums des Schweinerotlaufserums (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXIII. 1903. p. 214) wieder darauf hingewiesen, daß er keine Parallele zwischen agglutinierender und Schutzkraft nachzuweisen vermochte.

Hungertaube LVI.
 Hungert vom 15. Februar ab
 16. Februar 1 ccm Typhusbouillonkultur
 20. " 2 " " "
 23. " †

Kontrolltaube LVII.
 16. Februar 1 ccm Typhusbouillon
 20. " 2 " "
 25. " munter

Hungertaube LVIII.
 Hungert vom 1. März ab
 3., 6. und 8. März je 2 ccm Typhusbouillon
 9. März krank
 11. " früh †

Kontrolltaube LIX.
 Hungert vom 1. März ab
 3., 6. und 8. März je 2 ccm Typhusbouillon
 11. März lebt, munter

Wenn man somit, wie aus dem Gesagten hervorgeht, von den Veränderungen, welche die Produktion der Agglutinine unter dem Einflusse der Nahrungsentziehung erleidet, nicht auf diejenige der übrigen Antikörper direkt zu schließen berechtigt ist, so wird man doch andererseits gewiß annehmen dürfen, daß dieselben den gleichen allgemeinen Gesetzen gehorcht, und wird somit als weitere Folgerung unserer speziellen Studien die nachstehenden Sätze aufstellen können:

Die Nahrungsentziehung und vermutlich auch andere schädigende Eingriffe in den normalen Ablauf der tierischen Stoffwechselfvorgänge vermögen die Produktion der Antikörper, welche sich an die Einverleibung bakterieller Substanzen anschließt, deutlich zu beeinflussen. Die Richtung dieser Beeinflussung ist *ceteris paribus*, d. h. bei gleichbleibender Tierspecies und gleichbleibender Art des störenden Eingriffes, abhängig von den Eigenschaften der einverleibten Stoffe, und daher sowohl für die verschiedenen Bakterien-species als auch — wie man wohl annehmen darf — für die verschiedenen Substanzen, die sich in den Kulturen einer und derselben Species vorfinden, verschieden.

Ob auch die Herkunft des einzelnen Bakterienstammes und insbesondere seine Virulenz in dieser Hinsicht von Bedeutung ist, müssen besondere Versuche lehren, welche zum Teil bereits im Gange sind.

Ich möchte, im Anschlusse an das eben Auseinandergesetzte, nur noch einer Beobachtung Erwähnung tun, welche ich im Verlaufe dieser Studien mehrfach zu machen Gelegenheit hatte. Ich war wiederholt gezwungen, die Versuchstiere schon am Tage nach der letzten Injektion zu töten, um Serum zu erhalten, da das eine der beiden Tiere sich schwer krank zeigte und vermutlich die darauffolgende Nacht nicht mehr überlebt hätte. Das Blut dieser, nur um 1—2 Tage zu früh getöteten Tiere besaß ausnahmslos¹⁾ ein so geringes Agglutinationsvermögen, daß von einer Verwertung der erhaltenen Resultate für unsere Zwecke abgesehen werden mußte. Ohne Zweifel haben wir es hier mit derselben Erscheinung zu tun, welche kürzlich auch Deutsch (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXIII. 1903) beobachtet hat: nämlich mit einer Bindung der bereits im Blute vorhandenen Agglutinine durch die injizierten bakteriellen Substanzen²⁾. Ist dem

1) D. h. nicht nur das Blut des erkrankten, sondern auch das des gesund gebliebenen Tieres.

2) v. Dungern hat in ganz analoger Weise einen rapiden Abfall des Präzipitinhaltendes bei gegen Majaplasma immunisierten Kaninchen beobachten können, wenn er ihnen neue Mengen von Plasma in die Ohrvene injizierte. Auch er bezieht die Verminderung der Antikörpermenge auf eine einfache Absättigung des Präzipitins durch die eingeführte präzipitable Substanz.

so, dann muß aber die gesamte, oft nicht unbeträchtliche Agglutininmenge, welche wir am normalen Ablaufe unserer Versuche, d. i. etwa 3 Tage nach der letzten Injektion, beobachten konnten, in der ganz kurzen Zeit von 1—2 Tagen neugebildet worden sein, und es gibt uns somit das Verhältnis der bei dem Hungertiere und Kontrolltiere gefundenen Agglutinationswerte zugleich annähernd das Verhältnis der Geschwindigkeiten an, mit welchen die Agglutinine unter den verschiedenen Versuchsbedingungen entstehen. Wir können daher, unter Berücksichtigung dieser Tatsache, die oben dargelegten Versuchsergebnisse auch folgendermaßen formulieren: Die Entstehungsgeschwindigkeit der Agglutinine wird durch die Nahrungsentziehung bei der Taube bald beschleunigt, bald verlangsamt, je nach der Art der einverleibten Bakterien. Dadurch wird aber der Zusammenhang unserer Versuche mit den im ersten Abschnitte auseinandergesetzten theoretischen Anschauungen über die natürliche Bakterienimmunität, welche infolge der relativ langen Immunisierungsdauer bei unseren Experimenten vielleicht als ein ziemlich loser erscheinen konnte, in klareres Licht gerückt. Aber auch abgesehen hiervon, hat zweifellos die Veränderung in der Geschwindigkeit der Antikörperproduktion, welche durch die verschiedenen schädigenden Einwirkungen gesetzt wird, eine nicht zu unterschätzende Bedeutung für den ganzen Verlauf einer bereits ausgebrochenen Infektionskrankheit (vergl. Wassermann, Wesen der Infektion, in Kollé und Wassermanns Handb. d. pathogenen Mikroorganismen).

Literatur.

- 1) Fortschr. d. Med. 1890.
- 2) Riforma med. 1891. Zitiert nach Baumgartens Jahresbericht.
- 3) Atti della r. accad. dei fisiocritici in Siena. 1893. Zit. nach Baumgartens Jahresbericht.
- 4) Giorn. intern. delle science med. 1889. Nach Baumgartens Jahresbericht.
- 5) Riforma med. 1891. Nach Baumgartens Jahresbericht.
- 6) Sem. méd. 1890.
- 7) Compt. rend. T. XCIV. 1882.
- 8) Arb. a. d. kais. Ges.-A. Bd. IX. 1894.
- 9) Zieglers Beitr. z. pathol. Anat. Bd. VIII. 1890.
- 10) Bull. de l'acad. de méd. de Paris. 1878. Nach Metschnikoff, Die Immunität.
- 11) Ann. de l'Inst. Pasteur. T. IV. 1890.
- 12) Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. IX. 1891.
- 13) Il Morgagni. 1888. Zitiert nach Baumgartens Jahresbericht.
- 14) Zeitschr. f. Heilk. Bd. XVIII.
- 15) Arch. f. Hyg. Bd. XXVIII. 1897.
- 16) Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXVII. 1898.
- 17) Festschr. zur 100-jähr. Stiftungsfeier d. mediz.-chir. Friedrich Wilhelm-Institutes. Zitiert nach Kollmann.
- 18) Hyg. Rundschau. 1897.
- 19) Arch. f. Hyg. Bd. XLII.
- 20) Arch. f. Ophthalmol. Bd. LII. 1901.
- 21) Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XIII. 1899.
- 22) Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXXII. 1902.
- 23) Compt. rend. T. CXXIV.

Nachdruck verboten.

Zur Agglutination der Streptokokken.

[Aus dem k. k. serotherapeutischen Institute (Prof. Paltauf) und der k. k. Universitätskinderklinik (Prof. Escherich) in Wien.]

Von Dr. Paul Moser und Dr. Clemens Frh. v. Pirquet.

Mit 1 Tafel und 5 Figuren im Text.

(Schluß.)

Streptokokken mit mittellangen Ketten zeigen jedoch auch ohne weitere Vorbereitung typische mikroskopische Agglutination (Zeichnung 5, Kontrolle Zeichnung 4).

Die makroskopische Methode hat den Vorteil, daß sie bequemer auszuführen ist; aber einen besseren Einblick in den Vorgang der Agglutination und feinere Unterscheidungen gewährt die mikroskopische Anordnung.

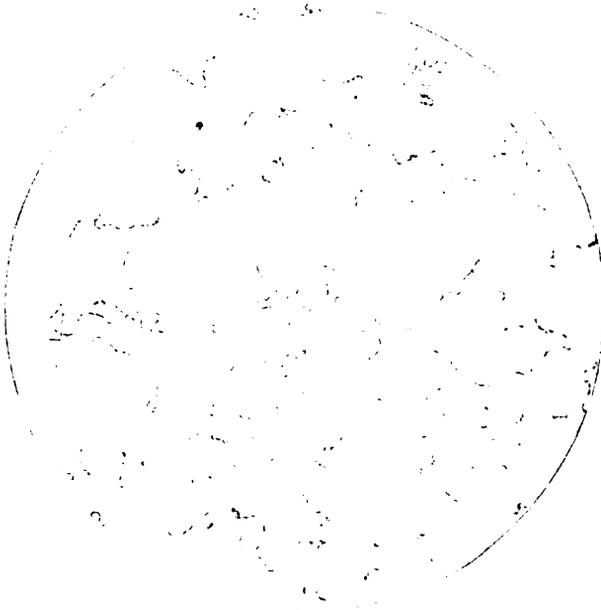


Fig. 4.

In Bezug auf die Konstanz der Befunde sind sie gleichwertig: bei beiden finden wir Schwankungen der Resultate in mäßigen Grenzen — welche teilweise von mehr oder minder reichlichem Wachstum in der Bouillon resp. der Menge der vorhandenen Streptokokken abhängen (Versuche mit *Streptococcus XIV*, Serum Bertram) (Versuch 6).

Bei gleicher Bouillonkultur finden wir die mikroskopische Agglutination um eine Verdünnung höher gehend als die makroskopische (Versuch 5); in Tröpfchenverdünnung ergibt sich eine weitere Erhöhung durch den eingangs erwähnten Fehler (Versuch 6).



Fig. 5.

Versuch 6.
Streptococcus XIV. Serum Bertram.

	Kultur- alter	Serum		Pipetten				Tröpfchenver- dünnung mikroskop. Beobachtung	
		vom	Alter	makroskop.		mikroskop.		+	-
				+	-	+	-		
9. Juli	1 Tag		ca. 1 Monat	8			9		
18. Novbr.	1 "	22. Septbr.	2 Monate					8	
	3 Tage	22. "	2 "					6	
	19 "	22. "	2 "					7	
	1 Tag	8. Juli	4 "					8	
21. Novbr.	2 Tage			7	9				
25. "	1 Tag							9	
13. Januar	1 "		2 Monate?	5	7	7			
17. "	1 "		2 "	5	7	7			
15. "	1 "	5. Januar	1/2 Monat	5	7	6	8	7	9

III. Resultate in Bezug auf die Streptokokken bei Scharlach.

Das Pferd Bertram war seit Beginn des Jahres 1900 mit Injektionen von Bouillonkulturen vieler Streptokokkenstämme behandelt worden, die sämtlich aus dem Herzblute von an Scharlach verstorbenen Kindern stammten.

Wir untersuchten nun zunächst solche Stämme, die bereits injiziert worden waren.

Streptococcus I—XII. Bei allen diesen bewirkte das Serum des Pferdes eine vollkommene makroskopische und mikroskopische Agglutination von mindestens 1 : 1000 (Verdünnung 5).

Es handelte sich nun darum, zu entscheiden, ob diese Agglutination nur eine Rückwirkung des Serums auf die zur Injektion verwendeten Stämme sei oder ob sie auf einer den Scharlachstreptokokken als solchen gemeinsamen Eigenschaft beruhe.

Zu diesem Zwecke wurden einerseits Stämme aus Scharlach geprüft, die noch nicht zur Injektion des Pferdes benutzt waren¹⁾, andererseits Streptokokken anderer Provenienz.

In die erstere Gruppe gehören weitere 9 Stämme aus dem Herzblute von Scharlachleichen, 2 aus Lymphdrüsenabscessen bei Scharlach. Bei allen diesen, mit Ausnahme eines einzigen (XXIII), sehen wir nun gleichfalls die spezifische Agglutination 1 : 1000.

Streptococcus XXIII wurde uns (wie *Streptococcus* XIX und XXI) in liebenswürdiger Weise durch Herrn Primarius Pospischill aus dem Materiale des Kaiserjubiläum-Kinderspitales zur Verfügung gestellt. Es stammt aus dem Herzblute

Bezeichnung des Streptococcus	Gezüchtet aus	Makroskopisch + vollkommen klar — getrübt				Mikroskopisch (in Tröpfchenverdünnung) + nur Häufchen — wie Kontrolle													
		Bertram-		Aronson-		Bertram-		Egmont-		Normal-		Wien. polyval. Streptokokk.-		Marmorek-		Tavel-		Denys-	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
I	Herzblut	1 000	16 000		16	64 000		16 000	64 000	16	16	64		4	4	16			
II	"	1 000	16 000	64	250	4 000		64 000		4		4				64			
IV	"	4 000		4000				64 000		16		64	4	250		4	1000		
V	"	4 000	16 000	250	1 000	64 000		64 000				4				4			
VI	"	16 000		4000	16 000														
VIII	"	1 000	16 000	64	250														
X	"	1 000	16 000	16	64														
XI	"	4 000	16 000	250	1 000														
XII	"	1 000	16 000	16	64														
XIV	"																		
Lindn.	"	1 000	16 000		16	250 000		64 000				16	64		16	16	64	64	
XV	"																		
Schütz	"	16 000			64			64 000		4	64	4	64		16	4	250		
XVIII	"																		
Post.	"	1 000	4 000	64	250	4 000		16 000				4		4				16	1000
XIX	"																		
Bor.	Lymphdr.	16 000		250	1 000														
XX	"																		
Palt.	Herzblut	1 000	16 000	64	250	1 000	16 000	7 000	64 000	4	16	16						64	1000
XXI	"																		
Posp.	"	4 000	16 000		64							4							
XXII	"																		
Lig.	"	4 000	16 000	4000	16 000	4 000	64 000	16 000				16						64	4000
XXIII	"																		
Haw.	"							16		4	4	64	16	250	16			1000	
XXIV	"																		
Lew.	"	1 000		64	1 000	16 000		16 000				4	4					16	
XXV	"																		
Mass.	Lymphdr.	1 000	4 000	64	4 000							4	1						250

1) Die Stämme XIV—XXV wurden seither auch zur Immunisierung verwendet. Wir unterzogen nur solche Streptokokken der Agglutination, welche aus inneren Organen bei Scharlach gezüchtet worden waren. Weitere Untersuchungen sind im Gange, welche das Verhältnis der Streptokokken aus skarlatinatösen Anginen zur Agglutination feststellen sollen.

eines $4\frac{1}{2}$ -jährigen Knaben, welcher am 28. Tage nach dem Beginne des Scharlachs starb. Die Sektionsdiagnose lautete: Lobuläre Pneumonie, Pleuritis, nekrotisierende Pharyngitis und Laryngitis, akute Nephritis.

Die Annahme ist nicht von der Hand zu weisen, daß es sich hier um eine Sekundärinfektion gehandelt haben könne. Der späte Todestag und die Pneumonie als hauptsächliche Todesursache würden dafür sprechen.

Die Scharlachfälle, aus denen die übrigen Streptokokken dieser Gruppe stammen, starben am 4. (XIV), 4. (XV), 7. (XXV), 10. (XXII), 21. (XVIII) Krankheitstage. XIX und XXV wurden intra vitam gewonnen. Von XX und XXI ist uns die Krankengeschichte unbekannt.

Auf den Streptococcus XIV möchten wir noch kurz eingehen, weil wir denselben hauptsächlich verwendet haben.

Richard Lindner, 3 Jahre; erkrankte am 11. Juni 1902 mit mehrmaligem Erbrechen, hohem Fieber, Delirien.

Am 12. Scharlachexanthem, Spitalsaufnahme. Unregelmäßig verbreitetes Exanthem, lakunäre Beläge an den Tonsillen, eiterig-schleimiger Ausfluß aus der Nase. Viele Drüsen tastbar, doch nicht über bohnen groß; Urin eiweißfrei. Fieber über 40°. Injektion von 180 ccm gewöhnlichem Pferdeserum ohne günstige Wirkung (l. c. Normalserum Krankengeschichte No. 5).

Am 14. Juni Auskühlen, Cyanose, Erbrechen, Exitus zu Beginn des 4. Krankheitstages.

15. Juni Obduktion (Prof. Paltauf): Pharyngitis acuta ulcerosa et fibrinosa, Gastritis fibrinosa, Bronchitis acuta, Nephritis parenchymatosa acuta, Scarlatina.

Dieser Streptococcus wurde 3 Wochen nach dem Tode des Kindes zum ersten Male geprüft und gab damals makroskopische Agglutination 1 : 64 000 (s. Versuch 6).

Nicht alle Streptokokkenstämme zeigen aber so hohe Agglutination sofort nach dem Herauszüchten aus dem Tierkörper.

So gab z. B. Streptococcus XXIV 13 Tage nach der Entnahme mit Serum Bertram vollkommene Agglutination nur in der Verdünnung von 1 : 4, 14 Tage später nach mehrmaliger Umzüchtung auf Agar und Bouillon erst die spezifische Reaktion; also ein ähnliches Verhalten, wie es Bail bei Typhus gefunden hat¹⁾. Ganz analog verhielten sich die Streptokokken XX, XXI, XXII.

Die einmal gewonnene Agglutinierbarkeit bleibt dann bestehen, doch schwanken die hohen Agglutinationswerte bei den einzelnen Versuchen um 1—2 Verdünnungen (Versuch 6). Aus diesem Grunde halten wir auch die Unterschiede in der Agglutinationshöhe zwischen Verdünnung 5 bis Verdünnung 7 (s. Tabelle) nicht genügend, um zwischen den einzelnen Stämmen Unterschiede zu machen.

Wir gingen diese Frage an, indem wir — nach dem Vorgange von de Veldes — Kaninchen durch Injektionen mit Bouillonkulturen eines einzigen Stammes immunsierten. Die zwei von uns mittels Scharlachstämmen hergestellten monovalenten Sera verhielten sich gegenüber den Scharlachstämmen ganz gleichartig, vollständig verschieden durch einen fremden Stamm das bedingte Serum.

Das Serum gegen Streptococcus I agglutiniert den Streptococcus I vollständig 1 : 1000, die Streptokokken IV, VIII, X, XII, XIV, XV vollständig 1 : 250, unvollständig 1 : 1000; den fremden Streptococcus Th (aus Stuhl) gar nicht.

Serum gegen Streptococcus XIV wurde mit 26 verschiedenen Streptokokkenstämmen sowohl makro- als mikroskopisch in den Verdünnungen von 1 : 64—1 : 1000 (I dex 3, 4, 5) geprüft. 17 von diesen Stämmen sind aus Scharlachfällen gezüchtet (I, II, III, IV, VIII, X, XI, XII, XIV, XV, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIV, XLVII). Makroskopisch agglutinierten von den Scharlachstämmen alle bis auf II und VIII. Vollständige Agglutination 1 : 1000 war bei I, IV, XI, XII, XIV, XV, XVIII,

1) Bail, Untersuchungen über die Agglutination von Typhusbakterien. (Prager med. Wochenschr. 1901.) — Versuche über Typhusagglutinine und Präzipitine. (Arch. f. Hyg. 1902.)

XIX, XX, XXI, XXII, XLVII, unvollständige Agglutination 1:1000 (vollständige 1:250) zeigten III, X, XXIV. Von den 9 anderen Streptokokken stammten 2 aus Peritonealeiter, 1 von einer Choreaendocarditis, 3 von Erysipel (1 vom Menschen, 2 von Kaninchen), 2 aus Pferdeabscessen, 1 von einer Kaninchenseptikämie. Von sämtlichen 9 Stämmen agglutinierten 1 Peritonitis- und der Chorea Stamm 1:1000, die anderen Stämme zeigten keine Agglutination.

Serum gegen Streptococcus Th aus Stuhl hinwiederum agglutiniert den eigenen Streptococcus 1:64, den XIV. reciprok 1:16, den Streptococcus I und II gar nicht.

Von Streptokokken anderer Herkunft — welche uns hauptsächlich durch die Freundlichkeit des Herrn Dr. Jellinek, Assistenten am k. k. Institute zur Darstellung von Diphtherieheilserum — zur Verfügung gestellt waren, prüften wir 17 Stämme mit dem Serum Bertram. Keiner von ihnen wurde 1:1000 agglutiniert, ein einziger zeigte Agglutination in der Verdünnung von 1:250 — ein aus dem Eiter eines Empyems gezüchteter Streptococcus.

Gleichzeitig mit dem Serum Bertram untersuchten wir eine Reihe anderer Sera auf ihre Agglutinationskraft. Das Serum des Scharlachstreptokokkenpferdes Egmont verhielt sich wie Serum Bertram.

Normales Pferdeserum übte keine mit der spezifischen Wirkung vergleichbare Beeinflussung aus (Verdünnung 1:64 durchweg negativ).

Gegenüber den Scharlachstämmen hatte weder Serum Tavel noch Serum Marmorek noch auch das durch Immunisierung mit scharlachfremden Streptokokken gewonnene Wiener Antistreptokokkenserum eine nennenswerte Wirkung (nicht über 1:16).

Nur das Serum Denys (Löwen) erwies sich als höherwertig, was damit zusammenhängen kann, daß es durch Injektion von Streptokokken aus Anginen erzeugt wird, unter denen sich Scharlachanginen befunden haben können (Agglutination in Tröpfchenverdünnung 1:16—1:1000). Ein uns von Denys übersandter Streptococcus wurde allerdings durch das Serum Bertram gar nicht beeinflusst.

Einer genaueren und zwar makroskopischen Auswertung aller Scharlachstämmen unterzogen wir nur das Serum Aronson, welches uns ohne Trikesolzusatz zur Verfügung gestellt wurde. Es gab mit dreien der Stämme IV, VI, XXII Agglutination bis 1:4000, zwei agglutinierte es nur 1:250, die übrigen in noch geringerem Maße.

Die Agglutinationsresultate, welche wir in unserer vorläufigen Mitteilung¹⁾ veröffentlichten, daß nämlich das Aronsonsche Serum keinen der damals geprüften 9 Stämme höher als 1:16 agglutinierte, waren wohl, wie Aronson angibt, durch den Trikesolzusatz des uns damals zur Verfügung stehenden Serums bedingt.

Die damals für Serum Bertram mitgeteilten Resultate waren mikroskopisch und durch Tröpfchenverdünnung gewonnen (Tafel rechts) und fielen darum höher aus, als jetzt bei Kubikcentimeterverdünnung und makroskopischer Beobachtung (s. Versuch 6).

Wir hatten damals auch für normales Pferdeserum einmal eine Agglutination von 1:64 gefunden; bei erneuter Nachprüfung fanden wir keine höheren Werte als 1:4. Das damals verwendete Pferdenormalserum war unsicherer Provenienz.

Endlich prüften wir noch Streptokokkenstämmen anderweitiger Herkunft mit verschiedenen fremden Seris, fanden dabei nur selten Agglutination.

So agglutinierte das Wiener Antistreptokokkenserum zwei der Stämme, mit welchen die betreffenden Pferde vorbehandelt waren, in der Verdünnung 1:1000 (Tröpfchenverdünnung), Serum Denys seinen homologen Stamm 1:64, Serum Aronson 2 Stämme Wiener Provenienz 1:250.

1) Sitzungsbericht der Gesellschaft für Kinderheilkunde auf der 74. Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte. 1902.

Schlußsätze.

- 1) Streptokokken aus Scharlachblut, welche längere Zeit auf künstlichen Nährböden gezüchtet sind, werden durch ein mit solchen Streptokokken hergestelltes Immunsérum, sei es mono- oder polyvalent, in der überaus größten Mehrzahl der Fälle in spezifischer Weise agglutiniert.
- 2) Die mikroskopische Agglutinationsmethode ist bei Streptokokken ebenso typisch als die makroskopische.

Anhang.

Agglutination von Scharlachstreptokokken durch menschliches Serum.

In Analogie anderer Infektionskrankheiten war es naheliegend, beim Serum des scharlachkranken Menschen agglutinierende Eigenschaften auf Streptokokken aus Scharlach zu vermuten.

Die Untersuchungen Baginskys und Sommerfelds fielen in dieser Richtung vollkommen negativ aus¹⁾.

Salge und Hasenkopf fanden dagegen durch eine andere Methodik hohe Agglutinationswerte (bis 1:500)²⁾.

Unsere Beobachtungen wurden nach Art der Gruber-Widalschen Reaktion angestellt; das Serum der Kinder wurde mit eintägigen Kulturen des *Streptococcus XIV* in den Verdünnungen 1:2, 4, 8 gemischt, nach 24 Stunden mikroskopisch auf seine Wirkung untersucht.

In der beifolgenden Zusammenstellung (p. 720) sind die Ergebnisse von 51 Untersuchungen mit dem Serum Scharlachkranker nach der Höhe der Agglutination geordnet.

Zur Kontrolle wurden 10 Serumproben von Placenten der Klinik Schauta und 18 von Kindern der inneren und der Masernabteilung des hiesigen Spitals entnommen. Nirgends lag eine positive Anamnese für überstandenen Scharlach vor. In dieser letzteren Untersuchungsreihe fand sich niemals vollständige Agglutination bei 1:8, dagegen einmal bei 1:4 (Endstadium von Meningitis), einmal 1:2 (Placentarserum), einmal unvollständige Agglutination 1:2 (Perityphlitis). Spuren von Agglutination in 5 Fällen; die übrigen 20 Sera hatten keine Wirkung (9 unter 10 Placenten, 5 unter 6 Masernkranken).

Aus diesen Ergebnissen können wir nur wenig schließen:

Deutliche Agglutination findet sich viel häufiger bei Scharlachkranken (28 von 52, d. i. 54 Proz.) als bei Nichtscarlatinösen (3 von 28, d. i. 11 Proz.). Bei Scharlach scheint sich die Agglutination häufiger in schweren Fällen (Prognose II—IV, 9 unter 12) als in leichten (Prognose I, 14 unter 33) zu finden.

Den Herren Professoren Paltauf und Escherich, sowie Herrn Dozenten Dr. Kraus sind wir für Rat und Unterstützung bei dieser Arbeit zu lebhaftem Danke verpflichtet.

1) Baginsky und Sommerfeld, Ueber einen konstanten Bakterienbefund bei Scharlach. (Berl. klin. Wochenschr. 1900. No. 27.)

2) Sitzungsbericht der Gesellschaft für Kinderheilkunde auf der 74. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte. 1902.

Name	Alter in Jahren	Prognose		Krankheitstag				Agglutination	
				1-7	8-14	15-21	22 u. s. w.	Vollständig	Unvollständig
Hofbauer, Anna	7	II		{ 2 3	8 11			2 8	4 4 8
Kram, Theresia	10	I		{			25 28	4 —	2 9
Heinde, Johann	7		III		9			3	2
Ernegger, Rudolf	9	I		{ 7				2	4
Trojna, Caroline	6	I				19		2	8
Pogatscher, Elisabeth	10	I		{ 7			27	2	4
Görlich, Maria	5	I			12			4	2
Thiemler, Josef	4		IV	1				2	2
Ondraček, Franz	7	II			14			2	4
„ Aloisia	8	I			14			2	2
„ Marie	4	II				18			Spur
„ Karoline		I			14				„
Kutalek, Karl	11	I			10				8
„ August	12	I			10				4
Bittner, Alois	6	I			13				5
Burghart, Leopoldine	3	II					40		2
„ Karl	9	I					40		2
„ Franz	3 1/2	I					46		3
Hofbauer, Anton	3	I		{ 7					4
Tuma, Otto	3		II	4					4
Rath, Josef	1 1/2	II		1					2
Doppler, Barbara	6		III	2					2
Bartu, Karl	10	I			9				2
Wasmer, Anton	4	I					30		2
Véscey, Rudolf	2 1/2	II		{ 4					2
Dařilek, Karl	8	I		{ 3					Spuren
Hubert, Franz	8	I		{ 5 3					„
Rutal, Willy	7	II							Spuren
Indinger, Karl	9	I			9				„
Winter, Josef	10	I			12				„
Kreuzburger, Franz	9	I				20			„
Švastal, Josefa	7	I		{			23 30 30		„
Löbe, Bernhard	6	I							Spuren
Hocath, Friedrich	4	II		2					keine Agglut.
Janisch, Leopold	4	I		{ 6					
Biychta, Hermine	5	I		{ 6					
Raab, Julius	3	I			9				
Schiffauer, Burgi	3	I			14				
Aschenbrenner, Mini	4	I							
Wolfram, Ludwig	6	I			13				
„ Marie	8	I				21			
Maurer, Franz	3	I				16			
Wlach, Stephanie	2 1/2	I				18			
Biber, Leopold	3	I					23		
Knoll, Johann	10	I					24		

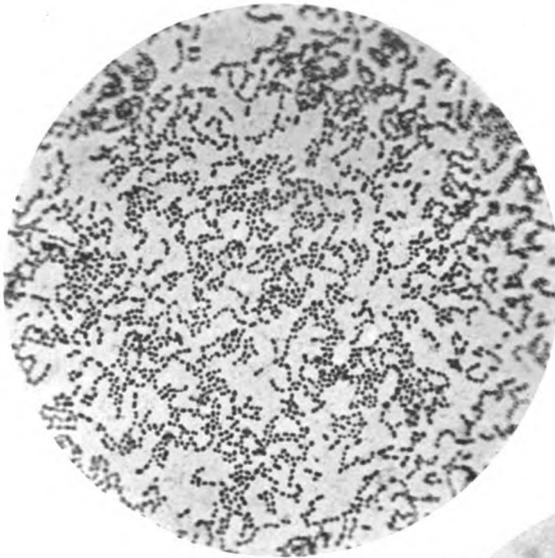


Fig. 1

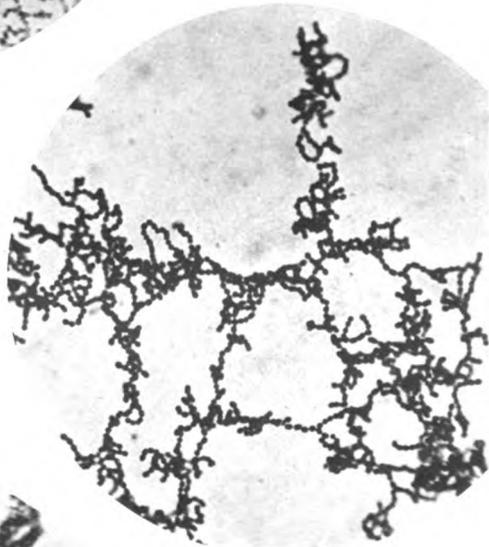


Fig. 2

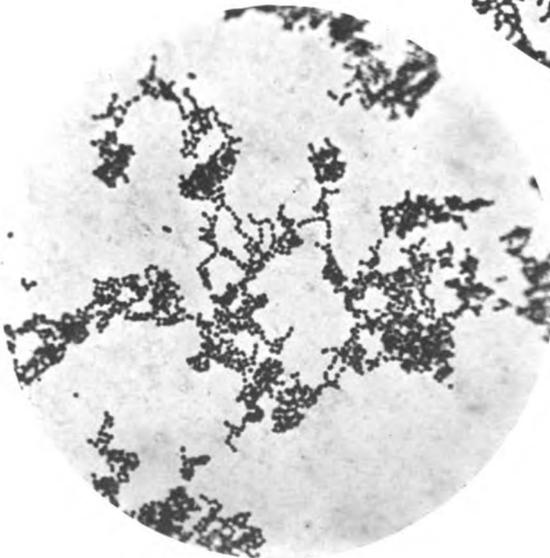


Fig. 3

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über die Wirkung einiger Organextrakte.

[Aus dem Laboratorium für Parasitologie der Kgl. Universität von Turin (Prof. Perroncito), Abteilung unter Leitung von Prof. Bruschetti.]

Vorläufige Mitteilung.

Von Dr. G. Ghedini.

Während die experimentellen Beobachtungen über die physiologische Wirkung des Extraktes von vielen Parenchymen und Geweben, die in den Organismus unter die Haut oder per os eingeführt werden, sehr zahlreich sind, war fast niemand, der dieselben mit anatomischer und histologischer Methode ausgeführt hat.

Eingehende Beobachtungen nach dieser Richtung hin machte nur Prof. Foà bezüglich des Nebennierenextraktes.

Während ich mit meinen Untersuchungen beschäftigt war, welche den Gegenstand der vorliegenden Mitteilung darstellen, beschrieb gelegentlich Ferrannini eigentümliche Läsionen im Herzen der mit Herzmuskelextrakt behandelten Tiere.

Albaran und Bernard beschrieben auch schwere Degenerationsläsionen in der Leber infolge der Einführung von Leber- oder Nierenextrakt.

Linossier ferner und Lemoine beobachteten merkwürdige Nierenveränderungen infolge der Injektion von normalem Blutserum.

Aber darüber hinaus geht nichts.

Und doch war es von großem wissenschaftlichen Interesse, in dieser Beziehung tiefere Kenntnisse zu gewinnen, als die, welche uns von der Physiologie geliefert wurden, zu wissen, welchen direkten Einfluß die Organextrakte im Organismus ausüben, welche uns die verschiedenen spezifischen cytolytischen Sera liefern, und es war auch von großem praktisch-medizinischen Interesse, zu erforschen, aus welchem Grunde die für einige an leichten und verlockenden Erfolgen so reiche Homöotherapie, von vielen anderen mehr als vernachlässigt, und sogar für die Ursache von nicht wenigen und nicht leichten Schädigungen gehalten wird.

Es schien mir daher interessant, in anatomisch-histologischer Richtung die Wirkung einiger Organextrakte zu untersuchen.

Die Extrakte, die ich gewählt habe, waren die folgenden: Der Extrakt von Pankreas, von Schilddrüse, von Thymus, von Gehirnsubstanz, von Hoden, von Ovarium, von Nebennieren.

Zunächst will ich einen kurzen Bericht über die angewandte Technik geben.

Die erwähnten Gewebe und Parenchyme — von Meerschweinchen und Kälbern herrührend — wurden in sterilisierter Reibeschale zu einem Brei zerrieben, mit sterilisierter physiologischer Lösung verdünnt und dann bei sorgfältiger Antiseptik erwachsenen Hunden (Mittelgewicht 6—8 kg) und Lämmern unter die Haut injiziert. Die Einspritzungen wurden jeden zweiten Tag eine verschiedene Zeit hindurch 1, 2, 3 und auch mehr Monate in einer Dosis von 20, 30 ccm für jedes Tier ausgeführt, indem gleichzeitig die reelle Menge der eingeführten Substanz für jedes Tier berechnet wurde: 2 Nebennieren von Meerschweinchen, eine Schilddrüse von Meerschweinchen, ein Viertel von Kalbsschilddrüse, ein Meerschweinchen-

gehirn, 1, 2 Meerschweinchenhoden, 3, 4 g von Thymus ungefähr für jedes Tier.

Die Tiere, welche inzwischen unter den besten hygienischen Bedingungen gehalten wurden, wurden fast immer durch Verblutung nach vorheriger leichter Chloroformnarkose getötet.

Es folgen nun ohne weiteres die makro- und mikroskopischen Befunde, welche ich vorläufig in summarischer zusammenfassender Weise anführe, da ich mir vorbehalte, sie binnen kurzem nach vollendeten Versuchen ausführlicher und in allen Einzelheiten wiederzugeben.

Die Stücke wurden entweder in Alkohol und in Formol 2—4 Proz. und in Zenkerscher und Flemmingscher Flüssigkeit fixiert. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin, Eosin, mit Hämatoxylin und van Giesonscher Flüssigkeit, mit Safranin und manchmal nach dem Verfahren von Pappenheim gefärbt.

Ernährungszustand ziemlich gut bei einigen Tieren, andere (mit Schilddrüse, Thymus, Nebennieren, Nervensubstanz) behandelte abgefallen.

Skelettentwicklung bei den sehr jungen Tieren (mit Thymus behandelt) sehr verlangsamt.

(NB. Bei den mit Nebennierenextrakt behandelten Tieren wurde immer ein ausgesprochenes Oedem beobachtet.)

Gehirn: Da ich die Beobachtungen noch nicht mit allen Methoden beendet habe, behalte ich mir vor, davon in der ausführlichen Arbeit zu sprechen. Makroskopisch nichts Bemerkenswertes.

Speicheldrüsen: Normal.

Schilddrüse: Fast immer an Größe zugenommen — von gelblicher Farbe — ziemlich hart — auf der Schnittoberfläche nichts Bemerkenswertes. Bei der mikroskopischen Untersuchung: Große Menge von Kolloidsubstanz in den Drüsenacinis, viele derselben sehr ausgedehnt. Die die Acini auskleidenden Elemente im allgemeinen gut erhalten und angeordnet, manchmal abgestoßen und in der Kolloidsubstanz mit Lymphocyten zusammen gemischt.

Manchmal auch zahlreiche kleine neugebildete Acini mit spärlicher Kolloidsubstanz in ihrem Inneren. Keine Gefäßausdehnung, keine Hämorrhagien, keine kleinzellige Infiltration, keine Bindegewebsreaktion.

Diagnose. Hyperfunktionierende Schilddrüse.

Lymphdrüsen. Enorme Volumzunahme, hauptsächlich bei den Achsel- und Inguinaldrüsen. Die letzteren sogar dick wie Nüsse. Die Schnittfläche rostrot, feucht wegen der ausfließenden Lymphe.

Bei der mikroskopischen Untersuchung: Wucherung der Lymphocyten, aus denen die Follikel und die Stränge bestehen — sehr zahlreiche Plasmazellen, Lymphräume sehr ausgedehnt und mit abgestoßenen Endothelien, Lymphocyten, polymorphen Leukocyten ausgefüllt, insbesondere merkwürdig jene Makrocyten, welche Hämosideringranula enthalten (Phagocytose), rote Blutkörperchen (manchmal). Manchmal auch Hyperplasie des Stützbindegewebes und sehr deutliche Gefäßerweiterung. Keine Hämorrhagien.

Diagnose: Einfache hyperplastische Lymphadenitis.
Herz und Lungen unverändert.

Magen, Darm, Pankreas ebenso.

Leber: Beinahe normale Größe und Gewicht. Fast immer diffus

oder unregelmäßig gefleckt, blaßgelb gefärbt; seltener tiefrot, obwohl der Tod des Tieres durch Verblutung erfolgte. Die Schnittfläche fast immer Aussehen nach gekochtem Eingeweide, grau, glänzend, mit gelblichen Flecken. Mikroskopische Untersuchung: Sehr viele Zellkerne zerstört oder wenig färbbar, das Protoplasma feinkörnig in einigen Fällen, in anderen flockig, amorph, unbegrenzt, in anderen fast verschwunden. Durch die Flemmingsche Reaktion deutliche, dicht aneinanderliegende Fetttröpfchen im Zellprotoplasma. Die Langhanssche Reaktion für das Glykogen sehr oft wiederholt, negativ.

Die Blutgefäße erweitert, voll von Blut, um die Gefäße herum und unregelmäßig verbreitet Zellgruppen mit spärlichem Protoplasma, mit kleinem, rundem, sehr färbbarem Kerne (Lymphocyten).

Zwischen den Elementen Hämatoidingranula oder gut erhaltene rote Blutkörperchen. Keine, oder manchmal schwache Bindegewebsreaktion.

Diagnose: Parenchymatöse degenerative Leberentzündung mit kleinzelligen perivaskulären oder ausbreiteten Infiltrationen, mit Resten von diffusen Hämorrhagien.

Milz: Beinahe von normaler Größe. Farbe ebenso. Schnittfläche braunrot, dichte und dicke Malpighische Körperchen.

Mikroskopische Untersuchung: Lymphocytenwucherung in den Malpighischen Körperchen, zahlreiche Plasmazellen, häufig reichliche pigmenthaltige Leukocyten. Zahlreiche Megakaryocyten (in einem Falle). Freie und zwischen den Milzelementen verbreitete Hämatoidingranula mit gut erhaltenen und manchmal sehr zahlreichen roten Blutkörperchen zusammen. Schwache, häufig fehlende Bindegewebsreaktion.

Diagnose: Hyperplastische folliculäre Splenitis mit Resten von alten und frischen Blutungen.

Nieren. Normale Größe. Gelbliche Farbe der Rinde. Schnittfläche: Die Rindensubstanz fast immer von normalen Dimensionen, gelblich mit rötlichen Streifen, die Marksubstanz weiß wie Elfenbein.

Mikroskopische Untersuchung: Die glomerulären Endothelien oft entstellt oder zerstört, in einigen Fällen serofibrinöses Exsudat, welches sich zwischen der Schleife und der Kapsel ansammelt; Lymphocyten und rote Blutkörperchen zwischen den Schleifen, die glomerulären Kapillaren immer blutüberfüllt. Die Epithelien der gewundenen Harnkanälchen, der Henleschen Schleifen und der geraden Kanälchen größtenteils kernlos oder mit flockigem amorphen Protoplasma.

Die Flemmingsche, mit Unterbrechungen angestellte Reaktion zeigt deutliche dichte und dicke schwarze Fetttropfen in den Elementen der geraden Kanälchen und der Glomeruli. Rote Blutkörperchen, serösfibrinöses Exsudat und spärliche Cylinder im Lumen der Kanälchen. In den Gefäßen reichliches Blut.

Gut erhaltene rote Blutkörperchen und Detriten derselben in den interkanalikulären Zwischenräumen. In der Mehrzahl der Fälle umschriebene Herde oder diffuse Zonen von Elementen mit spärlichem Protoplasma, mit rundem, kleinem Kerne. In einigen Fällen Reaktion seitens des Bindegewebes, besonders bei den Malpighischen Pyramiden.

Diagnose: Parenchymatöse degenerative Nephritis, oft verbunden mit kleinzelliger Exsudation und Infiltration, interstitielle Blutungen.

Nebennieren normal (in einigen Fällen schwache Blutungen).

Männlicher und weiblicher Geschlechtsapparat normal.

Thymus¹⁾. Sehr verminderte Größe, besonders in einem Falle. Mikroskopische Untersuchung: Follikelabnahme, starke Wucherung des interfollikulären Bindegewebes, besonders in einem Falle.

Knochenmark²⁾. Himbeerrote Farbe. Gallertige Konsistenz.

Mikroskopische Untersuchung: Sehr deutliche Menge von Fettsubstanz, von der Reaktion mit Sudan 3 gut gekennzeichnet. Zahlreiche eosinophile Zellen mit großen und kleinen Granulis, Lymphocyten, polymorphen Leukocyten, Phagocyten, welche Fettgranula enthalten. Bei den verschiedenen untersuchten Präparaten die Megakaryocyten abwesend.

Zusammenfassung: Die oberflächlichen, insbesondere die Achsel- und Inguinallymphdrüsen, die Leber, die Nieren, die Milz der behandelten Tiere zeigen deutliche Läsionen von entzündlicher Natur, vorwiegend nach dem Degenerations- und Infiltrationstypus und Andeutungen von Gefäßveränderungen; die Schilddrüse derselben zeigt sich hyperfunktionierend.

Keine Reaktion seitens der anderen, auch nicht der entsprechenden Organe.

Da ich diese Ergebnisse bei 14 Tieren regelmäßig und gleichmäßig erzielte, so scheint es mir nicht zu kühn, die erwähnten Läsionen auf die Elemente und auch auf die verschiedenen Nukleoproteide zurückführen zu können, welche ich im lebenden Organismus in fraktionierten, therapeutischen Dosen zirkulieren ließ.

Die besagten Substanzen würden sich im Kreislauf wie Gifte ohne spezifische Charaktere verhalten, indem sie die bei lokaler Berührung schon nachgewiesenen, von einigen Physiologen und Klinikern schon vermuteten Eigenschaften behalten und äußern — insbesondere und fast allein in den Organen, welche sie zuerst resorbieren; in den Organen, die zur Reinigung des Organismus dienen und die immer bei den verschiedenen Krankheitszuständen infolge einer toxischen Ursache³⁾ zu reagieren pflegen.

Indem ich diese von mir erzielten, obwohl ziemlich zahlreichen und regelmäßig positiven Resultate mitteile, liegt mir der Gedanke fern, denselben den Wert von endgültigen Schlüssen zuzuschreiben.

Die zwei neuen Serien von Tieren, die ich jetzt in Behandlung habe, werden hoffentlich meine Beobachtungen bestätigen und mein Vertrauen verstärken.

1—2) Die Beobachtungen beziehen sich auf 2 mit Thymusextrakt behandelte Lämmchen.

3) NB. Bei jedem einzelnen Tier wurde immer dafür gesorgt, durch bakterioskopische Untersuchungen und Kulturen die Abwesenheit von Mikroorganismen im Kreislauf festzustellen, welche den Versuch maskieren konnten, und ich bemerke auch, daß nicht der geringste Absceß vorkam.

Nachdruck verboten.

Ueber die Anfertigung und Aufbewahrung von Sporensidenfäden für Desinfektionszwecke.

[Aus dem hygien. Institut zu Göttingen.]

Von Dr. **Keisaku Kokubo**, Kaiserl. japan. Stabsarzt.

Von allen bakteriologischen Testobjekten, die zur Prüfung von Desinfektionsmitteln oder Desinfektionsverfahren dienen, sind wohl die Milzbrandsporen dasjenige, welches am frühesten und am häufigsten angewandt ist. Jeder aber, der einmal mit diesem Testobjekt gearbeitet hat, wird es als Uebelstand empfunden haben, daß seine Widerstandsfähigkeit in ziemlich weiten Grenzen schwankt. Soweit ich die existierende Literatur übersehe, wird man die Grenzen zu 1—15 Minuten strömenden Wasserdampf annehmen können.

Einen Grund dieser Schwankungen hat v. Esmarch¹⁾ in dem verschiedenen Verhalten der einzelnen Milzbrandstämme aufgefunden. Er hat gezeigt, daß Milzbrandstämme verschiedener Herkunft auch bei gleicher Art der Präparation große Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit aufwiesen, daß also gewissermaßen jedem Stamme eine spezifische Widerstandsfähigkeit gegen strömenden Wasserdampf zukommt.

Auf Anregung von Herrn Prof. v. Esmarch habe ich nun festzustellen versucht, ob nicht auch die Art der Herrichtung des Sporenmaterials von Einfluß sei, ob nicht auch ein und derselbe Stamm bei verschiedener Art der Herstellung Testobjekte von verschiedener Widerstandsfähigkeit lieferte. Eine derartige Untersuchung erschien um so mehr angebracht, als die meisten Autoren, welche über Abtötung von Milzbrandsporen gearbeitet haben, über die Herstellung ihres Testmaterials keine näheren Angaben machen.

Es war mir selbstverständlich nicht möglich, alle hier in Betracht kommenden Bedingungen zu variieren und auf ihren Einfluß zu untersuchen. Ich habe deshalb den sicher recht erheblichen Einfluß des Materiales, an dem die Sporen angetrocknet sind, außer acht gelassen, und meine Untersuchungen auf Seidenfäden, die wohl immer noch am häufigsten angewandt werden, und auch das bequemste Material darstellen, beschränkt. Die Imprägnierung der Sporen geschah entweder so, daß die vorher sterilisierten Fäden — Turnerseide No. 5 — mit der Pinzette in einer üppig gewachsenen Oberflächenkultur umgedreht wurden, wodurch reichliche Mengen der Kultur an ihr haften blieben. In einer anderen Versuchsreihe wurde dagegen die abgekratzte Kulturmasse in einer geringen Menge Bouillon aufgeschwemmt, und mit dieser Aufschwemmung die Fäden imprägniert. Als Nährboden zur Züchtung der sporenhaltigen Kulturen dienten Agar und Kartoffeln. Die Kulturen wurden bei 37° gehalten und waren 2 Tage alt. Eine besondere Versuchsreihe hatte ergeben, daß die Züchtungstemperatur ohne Einfluß auf die Widerstandsfähigkeit der Sporen war: 37° wurden deshalb gewählt, weil hier die Sporenbildung am raschesten vor sich ging. Die Anwesenheit zahlreicher, wohlentwickelter Sporen wurde jedesmal durch das Mikroskop festgestellt.

1) Zeitschr. f. Hyg. Bd. I. p. 67.

Ta-
Sporen auf Agar gezüchtet, in Bouillon auf-

Aufbewahrt	An der Luft getrocknet												Im				
	im Dunkeln				im Hellen				an der Sonne				im Dunkeln				
	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	
Stamm A abgetötet nach Min.	2	1— 2	1	1	2	2	1	1	(4) 2	(6) 1—2	(42) 1	(126) 1	2	1	1— 2	1— 2	
B	2	2	2	1— 2	2	2	2	1	(4) 2	(6) 1—2	(24) 1	(96) 1	1— 2	1— 2	1— 2	1— 2	
C	1— 2	1— 2	1	1	1— 2	1— 2	1	1	1—2	(4) 1—2	(6) 1	(24) 1	(96) 1	1— 2	1— 2	1	1
D	2	2	1— 2	1— 2	1	1	1	1	(4) 1	(6) 1	(24) 1	(96) 1	2	1— 2	1— 2	1— 2	
E	2	2	1— 2	1— 2	2	2	1	1	(4) 2	(6) 1—2	(24) 1	(96) 1	2	1— 2	1— 2	1— 2	
F	2— 3	2— 3	2	2	2— 3	2— 3	1	1	(4) 2—3	(6) 2—3	(24) 1	(96) 1	2	2	1— 2	1— 2	

Ta-
Sporen auf Agar-

Stamm A abgetötet nach Min.	10	10	10	7— 9	10	10	9— 10	6— 8	(4) 10	(6) 9— 10	(24) 6—8	(108) 6—7	10	10	9— 10	7— 9
B	5	5	5	4	5	4— 5	3— 4	3— 4	(0) 5	(0) 4—5	(24) 3	(84) 2	4— 5	4— 5	4— 5	4
C	7	7	6— 7	6	7	7	5	4— 5	(0) 7	(0) 6—7	(24) 5	(84) 3	6— 7	6— 7	6	6
D	3	3	2— 3	2— 3	3	3	2— 3	1— 2	(0) 2—3	(0) 2—3	(24) 2	(84) 1	2	2	2— 3	2
E	4	4	4	3— 4	4	4	3	2	(0) 4	(0) 4	(24) 2	(84) 1	3— 4	3— 4	3	3
F	7	7	6— 7	6	7	7	5	4	(0) 7	(0) 6—7	(24) 5—6	(84) 2—3	5— 6	5— 6	5— 6	5

Die mit Sporen imprägnierten Fäden habe ich teils an freier Luft, teils im Exsikkator über Chlorcalcium, teils im Vakuum getrocknet, und nachher teilweise im Dunkeln gehalten, teils dem zerstreuten Tageslicht, teils dem Sonnenlicht ausgesetzt. Die Widerstandsfähigkeit der so erhaltenen Sporenfäden gegen strömenden Dampf wurde mit Hilfe des von Ohlmüller angegebenen, auch von v. Brunn¹⁾ benutzten Apparates festgestellt.

Von der v. Brunn'schen Versuchsanordnung bin ich nur insofern

1) Centralbl. f. Bakt. Bd. XXVIII. p. 309.

belle I.

geschwemmt und dann an Fäden angetrocknet.

Exsikkator getrocknet								Unter der Luftpumpe getrocknet											
im Hellen				an der Sonne				im Dunkeln				im Hellen				an der Sonne			
6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.
2	2	1	1	(4) 2	(6) 2	(42) 1-2	(126) 1	2- 3	2	2	1- 2	2	2	2	1	(4) 2	(6) 1-2	(42) 1-2	(126) 1
1- 2	1- 2	1- 2	1	4 1-2	(6) 1-2	(24) 1	(96) 1	1- 2	1- 2	1	1	1- 2	1- 2	1	1	(4) 1-2	(6) 1-2	(24) 1	(96) 1
1	1	1	1	(4) 1	(6) 1	(24) 1	(96) 1	1- 2	1- 2	1	1	1- 2	1- 2	1	1	(4) 1-2	(6) 1-2	(24) 1	(96) 1
1- 2	1- 2	1- 2	1	(4) 1-2	(6) 1	(24) 1	(96) 1	1- 2	1- 2	1	1	1- 2	1- 2	1	1	(4) 1-2	(6) 1-2	(24) 1	(96) 1
1- 2	1- 2	1	1	(4) 1-2	(6) 1-2	(24) 1	(96) 1	1- 2	1	1	1	1- 2	1- 2	1	1	(4) 1	(6) 1	(24) 1	(96) 1
2	2	1	1	(4) 2	(6) 2	(24) 1	(96) 1	2	2	1- 2	1	2	2	1	1	(4) 2	(6) 2	(24) 1	(96) 1

belle II

Agar gezüchtet

10	9- 10	8- 9	6	(4) 10	(6) 9- 10	(24) 6-7	(108) 6	6- 7	6- 7	4	4	6	6	5	4	(4) 5-6	(6) 5-6	(30) 4-5	(60) 2
4- 5	4- 5	4	3- 4	(0) 4-5	(0) 4-5	(24) 3-4	(84) 2	4- 5	4- 5	4- 5	3- 4	4- 5	4- 5	4	3	(0) 4-5	(0) 4-5	(24) 2-3	(84) 1
6- 7	6- 7	5	4	(0) 6-7	(0) 6-7	(24) 4	(84) 2-3	6- 7	6- 7	5- 6	5- 6	6- 7	6- 7	5	4- 5	(0) 6-7	(0) 6	(24) 4	(84) 2
2	2	2	1	(0) 2	(0) 2	(24) 1-2	(84) 1	2	2	2	1- 2	2	2	2	1	(0) 2	(0) 2	(30) 1-2	(78) 1
3- 4	3- 4	2- 3	2	(0) 3	(0) 3	(24) 2	(84) 1	3- 4	3- 4	2- 3	2- 3	3	3	2- 3	1- 2	(0) 3	(0) 3	(24) 2	(84) 1
5- 6	5- 6	4- 5	3- 4	(0) 6	(0) 5-6	(24) 4-5	(84) 2	5- 6	5- 6	5	5	5	5	4- 5	4	(0) 5	(0) 5	(24) 4	(84) 2

abgewichen, als ich die Fäden nicht auf einem Drahtnetz dem Dampfe aussetzte, sondern sie zu diesem Zweck in ein Holzstäbchen einklemmte. Ich wollte damit die ungleichmäßige Benetzung der Fäden vermeiden, die bei der Verwendung des Drahtnetzes wegen des dort sich sammelnden Kondenswassers meistens nicht zu umgehen ist. Nach dem Herausnehmen aus dem Apparat wurden dann die Fäden mit sterilisierter Schere dicht an dem Holzstäbchen abgeschnitten und in Bouillon bei 37° mindestens 5 Tage beobachtet. Jedesmal wurden 2 Fäden zugleich benutzt; wenn sie verschiedene Resultate gaben, so ist das in den Tabellen besonders bemerkt. Die Temperatur des Dampfes schwankte je nach

Ta-
Sporen auf Kar-

Aufbewahrt	An der Luft getrocknet												Im			
	im Dunkeln				im Hellen				An der Sonne				im Dunkeln			
	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.
Stamm A abgetötet nach Min.	9	9	9	5	9	9	9	4	(4)	(6)	(6)	(88)	7	7	7	5
B	5	5	5	4	5	5	4	3	(0)	(0)	(30)	(78)	4	4	4	3
C	6	6	6	5	6	6	5	3	(0)	(0)	(30)	(78)	5	5	5	5
D	2	2	2	2	2	2	2	1	(0)	(0)	(30)	(78)	1	2	2	1
E	3	3	2	2	3	3	2	1	(0)	(0)	(30)	(78)	3	3	3	2
F	5	5	5	5	5	4	3	6	(0)	(0)	(30)	(78)	4	4	4	4

dem Barometerstande zwischen 98,5 und 100°. Die erste Prüfung fand 6 Stunden nach der Fertigstellung der Fäden, die zweite nach 24 Stunden, die dritte nach 8 Tagen und eine vierte nach 28 Tagen statt.

Sämtliche Versuche wurden in gleicher Weise an 6 verschiedenen Milzbrandstämmen, A—F, angestellt. Von diesen war A eine seit langer Zeit im Institut fortgezüchtete Kultur, C—F stammen aus Sporenmaterial, das von Herrn Prof. v. Esmarch in den Jahren 1882—1888 angefertigt ist. Ein besonderes Interesse verdient der Stamm B, weil er ein abgeschwächter Abkömmling von A ist. Er stammt von einem Sporenfaden von A, der 9 Minuten im Dampf gewesen und dann in Bouillon ausgewachsen war. Die dadurch erzielte Resistenzverminderung scheint eine dauernde zu sein, wenigstens zeigt dieser Stamm in sämtlichen Versuchen, in denen überhaupt Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen hervortraten, eine wesentlich geringere Widerstandsfähigkeit als A.

Die Ergebnisse der Versuche sind in den Tabellen I—III zusammengestellt. Tabelle I gibt die Resultate der mit Bouillonaufschwemmung hergestellten Sporenfäden. Hier ist weder zwischen den einzelnen Stämmen noch zwischen den verschiedenen Trocknungs- und Aufbewahrungsmethoden ein wesentlicher Unterschied zu konstatieren: fast alle Fäden wurden nach 2 Minuten abgetötet, und diese Zeit ging in 28 Tagen fast überall auf 1 Minute herunter. Da aber diese Zahlen sämtlich wesentlich niedriger sind, als die der Tabelle II und III, so ist anzunehmen, daß es sich hier von vornherein um abgeschwächte Sporen gehandelt hat. Es ist ja durch zahlreiche Beobachtungen erwiesen, daß feuchte Milzbrandsporen beim Einbringen in Bouillon in großer Zahl zu Grunde gehen; es erscheint deshalb nicht wunderbar, wenn die überlebenden eine Verminderung ihrer Resistenz erfahren.

Für die Herstellung von möglichst widerstandsfähigem Sporenmaterial ist deshalb das andere Verfahren zu empfehlen, bei dem die

belle III.
toffeln gezüchtet.

Exsikkator getrocknet								Unter der Luftpumpe getrocknet											
im Hellen				an der Sonne				im Dunkeln				im Hellen				an der Sonne			
6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.	6 St.	1 T.	8 T.	28 T.
7-8	7	6-7	5	(4) 6-7	(6) 6-7	(6) 6	(78) 2-4	7	7	6-7	4-5	7	6-7	6	4	(4) 7	(6) 6-7	(6) 6	(78) 3
4	4	3-4	3	(0) 4	(0) 4	(30) 3	(78) 1-2	4	4	3-4	3	4	4	3	2	(0) 3-4	(0) 3-4	(30) 3	(78) 1
5-6	5-6	4-5	3	(0) 5-6	(0) 5-6	(30) 3-4	(78) 2	5	5	4	4	5	5	4	3	(0) 5	(0) 5	(30) 3	(78) 1-2
2	2	1-2	1	(0) 2	(0) 2	(30) 1	(78) 1	2	2	2	1-2	2	2	1-2	1	(0) 2	(0) 2	(30) 1	(78) 1
3	3	2	1-2	(0) 3	(0) 3	(30) 2	(78) 1	3	3	2-3	2	2-3	2-3	2	1-2	(0) 3	(0) 2-3	(30) 1-2	(78) 1
4-5	4	4	3	(0) 5	(0) 4-5	(30) 3-4	(78) 1-2	4-5	4-5	4	4	4-5	4	3	2	(0) 4-5	(0) 4	(30) 2-3	(78) 1

Sporen ohne vorherige Aufschwemmung direkt auf die Fäden gebracht werden, indem man einfach die Fäden mit der Oberflächkultur innig in Berührung bringt. Auf diese Weise sind die Fäden hergestellt, deren Resultate in den beiden folgenden Tabellen mitgeteilt sind, und zwar waren bei Tabelle II die Kulturen auf Agar, bei Tabelle III auf Kartoffeln gewachsen.

Hier zeigen sich zunächst zwischen den einzelnen Stämmen erhebliche Differenzen. Am größten ist die Widerstandsfähigkeit des Stammes A, und zwar in sämtlichen Versuchen, dann folgen C und F, dann E, B und D.

Es wird also durch diese Versuche die v. Esmarchsche Beobachtung, daß die einzelnen Milzbrandstämme unter sich große Verschiedenheiten in der Widerstandsfähigkeit aufweisen, durchaus bestätigt. Daneben finden sich aber auch große Unterschiede je nach der Art der Herstellung und der Aufbewahrung, und zwar sind diese mit außerordentlicher Regelmäßigkeit bei allen Stämmen in gleichem Sinne vorhanden.

Zunächst ist hervorzuheben, daß die auf Agar gewachsenen Sporen durchweg etwas resistenter sind, als die von der Kartoffel.

Von den verschiedenen Trockenverfahren gibt das Trocknen an der Luft bei Zimmertemperatur die widerstandsfähigsten Sporen. Etwas geringer ist ihre Resistenz, wenn sie im Exsikkator, und noch geringer, wenn sie im Vakuum getrocknet werden. Beim Aufbewahren sinkt allmählich die Widerstandsfähigkeit, langsam im Dunkeln, etwas schneller im zerstreuten Tageslicht und noch schneller in der Sonne. Der Unterschied zwischen der Aufbewahrung im Dunkeln und an einem sonnigen Ort ist aber nicht so groß, wie man nach den sonstigen bakteriziden Eigenschaften des Sonnenlichtes erwarten sollte¹⁾.

1) Die eingeklammerten Zahlen in den Tabellen geben die Dauer des wirklichen Sonnenscheines in Stunden an.

Zur Erzielung möglichst widerstandsfähigen Sporenmateriales wird es sich hiernach also empfehlen, die in angegebener Weise hergestellten Fäden an der Luft bei Zimmertemperatur zu trocknen und im Dunkeln aufzubewahren. Allerdings läßt sich hierbei eine Verunreinigung durch Luftkeime häufig nicht vermeiden, so daß aus diesem Grunde unter Umständen das Trocknen im Exsikkator vorzuziehen ist.

Nachdruck verboten.

Ueber das Verhalten des Loefflerschen Mäusetyphusbacillus zu dem v. Drigalski-Conradischen Nährboden.

[Aus dem Institute für Hygiene und experimentelle Therapie in Marburg. Abteilung für Hygiene. Vorstand: Prof. Bonhoff.]

Von Dr. phil. C. Siebert in Marburg.

(Schluß.)

Zur Herstellung des agglutinierenden Serums wurde 4 Kaninchen je $\frac{1}{2}$ Agarkultur I, welche zuvor $\frac{1}{2}$ Stunde auf 60° erhitzt war, intravenös am Ohre injiziert. 3 Tiere gingen infolge der ersten Injektion zu Grunde. Auch bei dem letzten war eine erhebliche Wirkung zu bemerken, das Tier zeigte nach jeder Einspritzung eine mehrere Tage dauernde Prostration und fraß nichts, blieb aber am Leben. Es erhielt 28 Tage nach der ersten Impfung 1, 17 Tage nach der zweiten 2, 21 Tage nach der dritten 3 in der angegebenen Weise behandelte Agar-röhrchen intravenös injiziert. 16 Tage nach der letzten Injektion ging auch dieses Tier zu Grunde. Die Sektion ergab keine Veränderung der Organe, Mäusetyphusbacillen konnten nicht nachgewiesen werden. 14 Tage nach der zweiten und 20 Tage nach der dritten Einspritzung wurde Blut entnommen. Das erste Serum agglutinierte die Kultur I noch in der Verdünnung von 1:2000, das zweite hatte keinen höheren Agglutinationstitre.

Um mich zu überzeugen, daß ein speziell auf Mäusetyphus reagierendes Serum vorlag, führte ich Agglutinationsproben in der Verdünnung von 1:50, mit zwei verschiedenen Typhuskulturen, zwei Paratyphuskulturen und einer Kultur von *Bacterium coli* aus. In 4 Fällen war keine Spur von Agglutination zu bemerken, dagegen wurde die eine Paratyphuskultur (*B. Král*) noch in einer Verdünnung von 1:400 agglutiniert (ein sehr auffallendes Verhalten, das weiter untersucht werden wird¹⁾).

Die Agglutinationsprobe wurde makroskopisch in der üblichen Weise ausgeführt. 1 ccm verdünntes Serum wurde mit 1 Oese 24-stündiger Kultur im Reagenzglase verrieben, auf 20 Minuten in den Brutschrank gebracht und dann beobachtet. Nach kürzerer oder längerer Zeit, nach Gewinnung der Reinkulturen aus dem Tierkörper, wurde die Prüfung wiederholt, wobei sich ergab, daß die Agglutinierbarkeit um so größer

1) Dieses Verhalten verbietet nicht, vorliegendes Serum als ein für Mäusetyphus spezifisches zu betrachten, da schon wiederholt bei verschiedenen dieser Gruppe angehörenden Bakterien Gruppenagglutination beobachtet wurde.

wurde, je häufiger die Kulturen seit der letzten Tierpassage auf künstlichem Nährboden weiter geimpft waren. Dieses Verhalten stimmt mit dem bei anderen Bakterien, z. B. dem Pestbacillus durch vorgenommene Agglutinationsversuche, festgestellten Tatsachen überein (5).

Weiter habe ich festgestellt, daß das Serum, welches die Kultur I am 8. Februar im Verhältnisse von 1:2000 agglutinierte, 52 Tage später nur noch bei stärkerer Konzentration von 1:600 agglutinierte. Auch dieses Verhalten stimmt insofern mit bekannten Tatsachen überein, als wahrscheinlich eine teilweise Umsetzung von Agglutininen in Agglutinoide stattgefunden hat.

Die Ergebnisse der Untersuchungen, wie die Kulturen auf Mäuse wirken und über das Verhalten der aus den eingegangenen Tieren erhaltenen Kolonien dem v. Drigalski-Conradischen Nährboden gegenüber, sind in Tabelle II zusammengestellt.

Von 7 subkutan behandelten Mäusen gingen also nach Ausweis der Tabelle 4 nach 1 Tage, je 1 nach 2, 3 und 4 Tagen zu Grunde. Aus diesen konnten blaue Kolonien mit positiver Agglutinationsprobe in allen Fällen isoliert werden.

An 22 Mäuse wurden M.-T.-Kulturen und Organe der infolge von M.-T. verendeten Tiere verfüttert, von diesen gingen 20 ein, und zwar 8 nach 1—3 Tagen, 6 nach 5—7 Tagen, 3 nach 10—11 Tagen und 3 nach 19—24 Tagen. Aus dem Darne wurden in 20 untersuchten Fällen 15mal blaue Kolonien isoliert, aus den Organen wurden 13mal Ausstriche auf den Drigalski-Nährboden gemacht, wobei 11mal aus der Milz, je 9mal aus Herzblut und Leber, 7mal aus Nieren blaue Kolonien erhalten werden konnten. Im ganzen wurden bei diesen 20 Fällen 18mal blaue und rote, je 1mal nur rote und nur blaue Kolonien isoliert. Die aus 19 verschiedenen Tieren stammenden blauen Kolonien gaben nur in 8 Fällen positive Agglutinationsprobe, was wohl dadurch zu erklären sein dürfte, daß aus Darm und Organen nur je 1 Ausstrich gemacht wurde. Der Mäusetyphusbacillus scheint hiernach, per os gegeben, im Organismus nur in beschränkter Menge vorhanden zu sein. Und nicht alle blauen Kolonien sind Mäusetyphusbacillen.

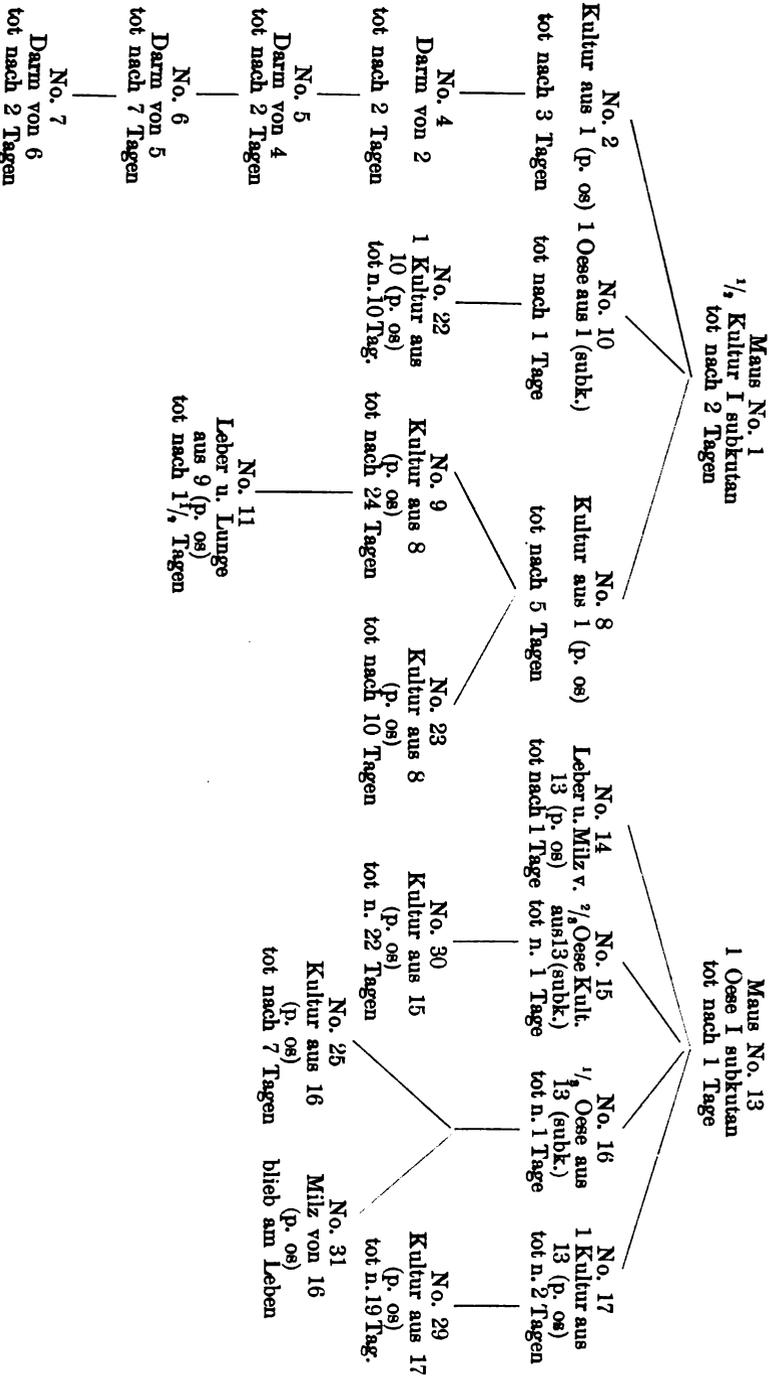
Die Mäuse 3 und 28 erhielten zur Kontrolle je 1 Agarkultur von blauen, nicht agglutinierten Kolonien per os gereicht. Beide Mäuse blieben am Leben.

Loeffler (1) nennt als spätesten Zeitpunkt, an dem der Tod der mit Mäusetyphus per os infizierten Tiere eintritt, den 13. Tag, Lunke-witsch (6) für Hausmäuse, welche mit den Kadavern der an M.-T. verendeten Feldmäusen gefüttert wurden, den 47. Tag, Mereshkowsky (7) sogar den 63. Tag. Um zum Ausdruck zu bringen, wie sich bei meinen Versuchen die mehrmals durch den Tierkörper eingegangenen Kulturen bezüglich ihrer Wirksamkeit verhalten, gebe ich in Tabelle III eine reihenweise Zusammenstellung der Versuchstiere, die mit Darm und Organen oder mit Reinkulturen aus infolge von Mäusetyphus verendeten Mäusen infiziert wurden.

Es geht aus dieser Zusammenstellung hervor, daß eine Erhöhung der Wirkung der Kulturen durch mehrmaliges Hindurchgehen durch den Tierkörper nicht erreicht wird.

No. 28 als 5. und No. 31 als 4. Glied der Reihe ist nicht eingegangen, bei No. 9, 30 und 29, vierten Gliedern der Reihe, trat erst nach 24, 22 und 19 Tagen der Tod ein. Am wirksamsten zeigten sich,

Tabelle III.
Kultur I.



abgesehen von den subkutan gegebenen Kulturen, weiter verfütterter Darm und Organe von verendeten Tieren.

Aus der Zusammenstellung geht ferner hervor, daß der Mäusetyphusbacillus mehrere Generationen hindurch immer wieder auf die angegebene Methode isoliert werden konnte.

Die Resultate der mitgeteilten Untersuchungen fasse ich in folgendem kurz zusammen:

Der Loefflersche Mäusetyphusbacillus wächst auf v. Drigalski-Conradischem Nährboden in blauen Kolonien.

Kaninchen sind recht empfindlich gegen Endotoxine des Mäusetyphusbacillus. Es gelingt, Agglutinine bei Kaninchen zu erzeugen.

Der v. Drigalski-Conradische Nährboden ist unter gleichzeitiger Anwendung der Agglutinationsprobe zur Isolierung des M.-T.-Bacillus geeignet.

Literatur.

- 1) Loeffler, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XI. No. 5.
- 2) Laser, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XI. No. 6/7.
- 3) v. Drigalski-Conradi, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIX. Heft 2.
- 4) Kayser, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXXI. p. 426.
- 5) Kolle und Martini, Dtsch. med. Wochenschr. 1902. No. 1—4.
- 6) Lunkewitsch, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XV. No. 22.
- 7) Mereshkowsky, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XVI. p. 612.

Nachdruck verboten.

A simple method of making collodion sacs for bacteriological work.

[From the Bacteriological Laboratories of the University of Wisconsin.]

By William Dodge Frost, M. S.

Instructor in Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, Wis., U. S. A.

With 3 Figures.

The method about to be described was devised in the course of some work requiring a very large number of sacs. The experience of nearly a year indicates that the method is suited for general use. The technique is very simple and the method seems to combine many of the good points in the previously described methods.

The detailed method of procedure is as follows:

Forming the sac. Glass tubes are selected, of any desired size, with evenly rounded bottoms. Usually a small sized test-tube will be found to be of the right size. Thick collodion is then poured into the tube to a depth equal to the desired length of the sac. The collodion is then poured out along one side of the tube into another tube and from this one to another and so on until it is all used up or becomes filled with bubbles. The desired length of the tube can be secured in all of the tubes by tipping and rolling them thus bringing them collodion into contact with the glass to the desired height. As the tubes are coated they are placed, mouth down, in a wire basket or test-tube rack as indicated in Fig. 1. In this way the extra collodion drains off and

free access of air dries and hardens the collodion; leaving a thin coat covering the inner surface of the tube. The thickness of the coat depends on the consistency of the collodion. A ten per cent. collodion, in equal parts of alcohol and ether, makes a sufficiently thick coat for ordinary purposes. A three per cent. solution can be used to make tubes for chemical purposes. But it must be remembered that a thicker solution makes a stronger but slower dialysing sac and longer air drying makes a tougher but slower one. It seems necessary to have a tough sac since it has been found that bacteria will sometimes pass through a sac which will hold water. The collodion is allowed to air dry from a few minutes to several hours. When thoroughly air dry the sac usually shrinks from the tube and may be easily pulled out. The drying may be stopped at

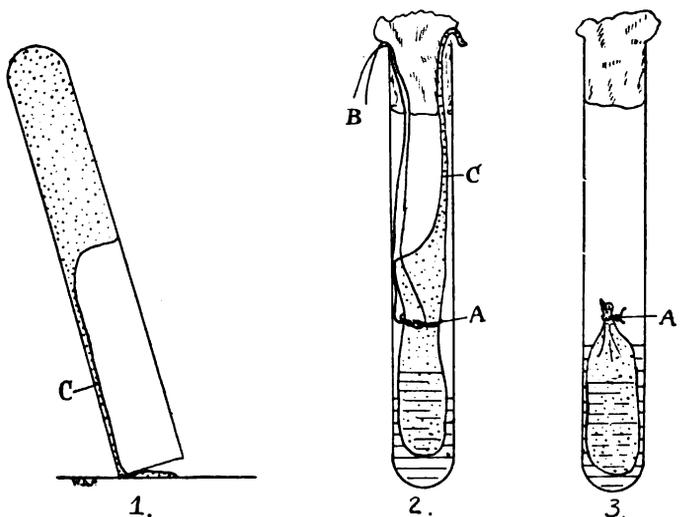


Fig. 1. Tube inverted to allow the extra collodion to drain off and the film to air dry.

Fig. 2. Sac ready for sterilization. *A* Surgeons knot. *B* Ends of cord. *C* Tongue of collodion.

Fig. 3. Sac ready to be inoculated into animal.

any point by filling the tube with water and after standing a few minutes the collodion shrinks and the sac may be easily removed. Should cold water fail to loosen the sacs warm water will. There is very little danger from bubbles in this method as in the older ones, since any which form either spontaneously rupture or settle towards the mouth of the sac and are later cut off.

According to this method a large number of sacs may be made in a short time. They may be kept for a long time in water, but become brittle if allowed to dry after they have once been hardened in water.

Sterilization of sac. The sacs are filled from one fourth to three fourths full with bouillon or other culture medium if desired. They are then immersed in a test-tube of the medium. The sacs are held in position in the test-tube by means of the tongue formed by the

collodion flowing out of the tube. This tongue is folded over the lip of the tube (Fig. 2, *c*). Before, however, the sac is put in the test-tube a piece of cotton or silk cord is placed around the sac near the top and held in position by means of a surgeon's knot, loosely drawn. The cord should be quite stout so that the sac can later be tightly closed. The ends of the cord are brought outside of the tube as shown at *b* (Fig. 2). Sterilization may be accomplished either in the autoclav or by means of the intermittent method of sterilization.

Inoculation and testing of sac. The medium is inoculated by means of the platinum needles in exactly the same way in which tube cultures are ordinarily inoculated. The tube thus inoculated should be incubated for twenty four hours and if the medium outside of the sac remains clear the sac may be used. Otherwise it should be discarded. This testing of the integrity of the sac is necessary whatever method of making it is employed.

Sealing the sac. The tube is placed in a tumbler or test-tube rack. The sac is then pulled out of the tube until the cords can be drawn tight so as to close the sac and securely tied. With sterile scissors the end of the sac is cut off a few millimeters above the constriction. If there is any moisture on the inside of the sac above the neck this must be removed with sterile filter paper and then a few drops of a thin solution is placed in the neck so as to hermetically seal the sac. The long and contaminated ends of the cord are now cut off, the sac dropped back into the test-tube, and the cotton stopper replaced (Fig. 3). The sac is now ready to be placed in the body cavity of an animal. The method of procedure here is of course the same as in any other method.

Advantages of this method:

- 1st. Simplicity.
- 2nd. No danger from air bubbles.
- 3rd. May be made of any size or shape.
- 4th. No glass to break or irritate the animal.
- 5th. Maximum amount of dialysing surface.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Einreichung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Inhalt.

- Abbott, A. C.**, The adrenal gland and its active principle in their relations to cytolyins and antitoxin production, p. 696.
- Bongert, J.**, Beiträge zur Biologie des Milzbrandbacillus und sein Nachweis im Kadaver der großen Haustiere. (Forts.). p. 623.
- Bosc, F. J.**, Les Epithéliomas parasitaires. La clavelée et l'Epithélioma claveloux. (Schluß.), p. 666.
- Friedmann, Friedrich Frans**, Der Schildkrötentuberkelbacillus, seine Züchtung, Biologie und Pathogenität, p. 647.
- Frost, William Dodge**, A simple method of making collodion sacs for bacteriological work, p. 733.
- Ghedini, G.**, Untersuchungen über die Wirkung einiger Organextrakte, p. 721.
- Ghon, Anton u. Sachs, Milan**, Beiträge zur Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen. (Schluß.), p. 609.
- Hersog, H.**, Die Abschwächung der Säugertuberkulosebacillen im Kaltblüterorganismus. (Schluß.), p. 675.
- Hoke, Edmund**, Ueber Komplementbindung durch Organzellen, p. 692.
- Ito, Sukehiko**, Ueber die Aetiologie von „Ekiri“, einer eigentümlichen, sehr akuten, ruhrartigen epidemischen Kinderkrankheit in Japan. (Schluß.), p. 659.
- Kokubo, Keisaku**, Ueber die Anfertigung und Aufbewahrung von Sporensidenfäden für Desinfektionszwecke, p. 725.
- Lord, Frederick T.**, Diplococcus intracellularis meningitidis (Weichselbaum) in the nose. Report of a case without Meningitis and review of the literature, p. 641.
- Macfadyen, Allan and Rowland, Sydney**, Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus, p. 618.
- Madsen, Thorvald**, La constitution du poison diphtérique, p. 630.
- Moser, Paul u. Frh. v. Firquet, Clemens**, Zur Agglutination der Streptokokken. (Schluß.), p. 714.
- Müller, Paul Theodor**, Zur Theorie der natürlichen antibakteriellen Immunität. (Schluß.), p. 700.
- Sachs, Hans**, Ueber Differenzen der Blutbeschaffenheit in verschiedenen Lebensaltern, p. 686.
- Siebert, C.**, Ueber das Verhalten des Loefflerschen Mäusetyphusbacillus zu dem v. Drigalaki-Conradischen Nährboden. (Schluß.), p. 730.

Nachdruck verboten.

Das Verhältnis der Milchsäurebakterien zum *Streptococcus lanceolatus* (*Pneumoniococcus*, *Enterococcus* u. s. w.).

[Aus dem hygienischen Institut in Bonn.]

Von Prof. **Kruse**.

Wer sich mit der Frage der Milchsäuregärung beschäftigt hat, wird die darin herrschende Verwirrung bemerkt haben. Sie fing damit an, daß Hueppe, der erste Forscher, der mit den Hilfsmitteln der modernen Methodik an das Studium der Milchsäurebakterien heranging, eine Beschreibung von ihnen lieferte, die offenbar auf den gewöhnlichen Erreger der Milchsäuregärung nicht paßt, sondern auf einen seltenern Organismus, der allerdings auch die Eigenschaft hat, Milchsäuregärung zu erzeugen. Allmählich ist das von sehr zahlreichen Autoren anerkannt worden; das Unglück wollte aber, daß gerade diejenigen, die zuerst eine gute Schilderung der wahren Milchsäurebakterien gaben, nämlich Günther und Thierfelder, an der Identität ihrer Mikroorganismen mit den Hueppeschen festhielten. Die Verschiedenheit beider Bakterien erkannte Leichmann, er hatte aber den verhängnisvollen Gedanken, den gewöhnlichen Milchsäureerreger *Bact. lactis acidi* im Gegensatz zu Hueppes *Bac. acidi lactici* zu nennen. Dadurch war erst recht der Konfusion Vorschub geleistet; sie mußte noch dadurch gesteigert werden, daß etwa gleichzeitig Lehmann und Neumann sowie Kruse in den von ihnen bearbeiteten Handbüchern die Namen *Bacterium Güntheri* und *Bacillus lacticus* einführten, während Kozai später von einem *Bacillus acidi paralactici* sprach. Alle diese Autoren sind zudem nicht von dem Vorwurf freizusprechen, daß sie die systematische Stellung, die natürlichen Verwandtschaften der von ihnen benannten und beschriebenen Bakterien nicht klar erkannten. Ich selbst hoffe, bald meinen Fehler wieder gutmachen zu können, möchte aber schon hier in aller Kürze einige Resultate meiner Untersuchungen feststellen. Von der chemischen Seite der Frage, die ebenfalls sehr der Klärung bedarf, spreche ich absichtlich nicht.

Hueppes Milchsäurebakterium ist identisch mit dem *Bacillus aërogenes*, wie ich (Flügges Mikroorganismen. Bd. II. 1896. p. 340) das Escherichsche *Bact. lactis aërogenes* genannt habe. Es ist sehr häufig in der freiwillig sauer gewordenen Milch vorhanden, aber regelmäßig in so geringen Mengen, daß es mit dem Prozeß der Säuerung nichts zu tun haben kann. Es färbt sich — das möchte ich gegenüber Lehmann und Neumann (Atlas und Grundriß der Bakt. 2. Aufl. 1899) betonen — nicht nach Gram; die Unterscheidung eines grampositiven *B. acidi lactici* von dem *B. aërogenes* ist hinfällig. Die Gramsche Färbung kann allerdings dadurch vorgetäuscht werden, daß die Kultur mit den echten Milchsäurebakterien verunreinigt ist. Eine solche Verunreinigung kann selbst geübten Bakteriologen vorkommen, weil die Kolonien der echten Milchsäurebakterien auf den Platten aus saurer Milch so klein und so zahlreich sind, daß sie manchmal nicht ohne weiteres sich von den viel größeren des *Bac. aërogenes* trennen lassen.

Der gewöhnliche Erreger der Milchsäuregärung ist dagegen ein Mikroorganismus, der zu den nächsten Verwandten des *Streptococcus lanceolatus*, d. h. des *Pneumococcus*, gehört. Seine Gestalt, seine Neigung zur Kettenbildung, seine färberischen Eigenschaften (Gram), sein Verhalten zu den Nährböden, auch zur Milch sind im wesentlichen die gleichen. Unterschiede liegen darin, daß das Milchsäurebakterium auch bei niedrigerer Temperatur wächst, und soweit bisher bekannt, keine Krankheiten bei Tieren und Menschen verursacht. Die etwas ovale, manchmal sogar deutlich stäbchenartige, an dem Ende zugespitzte Form der Milchsäurebakterien findet sich bei dem *Pneumococcus* genau in derselben Weise wieder und hat auch manche Autoren bewogen, den letzteren unter die Stäbchenbakterien einzureihen. Das hat aber schon deswegen seine Schwierigkeiten, weil die echte Kokkenform hier gerade wie auch beim Milchsäurebakterium gar zu häufig vorkommt. Man könnte sich nun dadurch helfen, daß man für diese morphologisch und biologisch gut charakterisierte Gruppe von Bakterien einen besonderen Genusnamen, wie *Coccobacillus* oder *Streptobacillus* einführt. Den letzteren würde ich selbst empfehlen, wenn nicht ein wichtiger Umstand dagegen spräche, nämlich die außerordentlich nahen Beziehungen des *Pneumococcus* zu dem sogenannten pyogenen *Streptococcus*, die namentlich seit meinen mit Pansini gemeinschaftlich ausgeführten Untersuchungen (*Zeitschr. f. Hygiene*. Bd. XI. 1892) fast allgemein anerkannt sind. Ich schlage daher vor, das Milchsäurebakterium *Streptococcus lacticus* zu nennen. Daß diese Bezeichnung eine naheliegende ist, erhellt auch schon daraus, daß zahlreiche Autoren aus Milch und Milchprodukten Organismen isoliert haben, die sie Streptokokken nannten, und die sich doch in keiner Weise scharf von den Milchsäurebakterien unterscheiden lassen (vergl. z. B. den *Streptococcus acidilactici* von Grotenfeldt, die Streptokokken des Kumys von Freudenreich); und vielen anderen Forschern wird es uneingestandenmaßen gegangen sein, wie mir selbst, sie werden sich gewundert haben, warum man die Milchsäurebakterien durchaus zu den Bacillen, statt zu den Streptokokken gestellt hat.

Selbstverständlich ist der *Streptococcus lacticus* in ähnlicher Weise der Variabilität unterworfen, wie der *Streptococcus pyogenes* und *lanceolatus*, der *Bacillus aërogenes* u. s. w. Unter mehreren Dutzend Stämmen, die ich aus saurer Milch isoliert habe, sind einige, die in Gelatine fast so schlecht wachsen wie der *Pneumococcus*, andere, die Milch nur sehr langsam zur Koagulation bringen oder nicht so viel Säure bilden, daß eine Gerinnung erfolgt; bei einzelnen herrscht die Stäbchen-, bei anderen die Kokkenform vor. Auch durch die künstliche Kultur gelingt es, ähnlich wie beim *Pneumococcus*, solche Varietäten zu erzeugen; wahrscheinlich wird ein genaues Studium den Beweis erbringen, daß eine scharfe Grenze zwischen dem *Streptococcus lacticus* und dem *Streptococcus lanceolatus* ebenso wenig vorhanden ist wie zwischen dem *Streptococcus lanceolatus* und dem *Streptococcus pyogenes*. Immerhin ist die Unterscheidung dieser 3 „Species“ aus praktischen Gründen empfehlenswert.

Für wenig ersprießlich halte ich es dagegen, alle diese so zahlreichen Varietäten zum Range von Arten zu erheben und besonders zu benennen. Z. B. sind der *Streptococcus enteritidis* von Hirsch-

Libbmann und der *Enterococcus Thiercelins* meines Erachtens weiter nichts als echte Milchsäurebakterien, wie sie im Darm von Kindern und Erwachsenen, Fleisch- und Pflanzenfressern regelmäßig vorkommen. Uebrigens scheint der *Streptococcus lacticus* gleich dem *Streptococcus lanceolatus* auf allen Schleimhäuten ein häufiger Gast zu sein, auf beide paßt also recht gut der Name der Schleimhautstreptokokken (vergl. Kruse, Pansini und Pasquale, Centralbl. f. Bakt. Bd. VII. 1890. No. 21).

Nachdruck verboten

Ueber die Anpassung der Bakterien an die Abwehrkräfte des infizierten Organismus¹⁾.

[Aus dem hygienisch-bakteriologischen Institute der Universität Krakau, Vorstand Prof. O. Bujwid.]

Von Dr. Philipp Eisenberg, Assistenten am Institute.

I.

Ein Fall von *Pyocyaneus*infektion nebst Bemerkungen über die Serodiagnostik dieser Infektionen.

Die pathogenetische Bedeutung des *Pyocyaneus* für den Menschen ist bisher noch nicht aufgeklärt. Einerseits scheint es in Uebereinstimmung mit der von Schimmelbusch vertretenen Auffassung keinem Zweifel zu unterliegen, daß dieser Mikroorganismus, ein naher Anverwandter des ubiquistischen *B. fluorescens liquefaciens*, ein steter Bewohner der menschlichen Hautdecken, in der Mehrzahl der Fälle, wo wir ihn auf Wunden als Begleiter des sogenannten blauen Eiters finden, hier nur als ganz harmloser Gast verweilt. Andererseits zeigen die Untersuchungen zahlreicher Forscher, daß er unter besonderen Umständen beim Menschen ernste Erkrankungen hervorzurufen im stande ist, die sogar letal enden können. Normalerweise unfähig, die Schutzkräfte des Organismus zu überwinden, kann er, wenn irgendwelche Faktoren diese Kräfte herabsetzen oder vernichten, aus einem ungefährlichen Gast ein offensiver Feind werden und pathogenetische Wirkungen entfalten. In Uebereinstimmung mit dieser Anschauung sehen wir, daß die *Pyocyaneus*-Infektionen am öftesten im Gefolge anderer Erkrankungen auftreten, indem sie im abgeschwächten Organismus ein geeignetes Substrat finden oder als Sekundärinfektionen, wenn durch die Wirkungen anderer Mikroorganismen dieses Substrat bereits vorbereitet ist. So finden wir im Falle von Lanz und Luscher eine chronische Strumitis nach einer Lungen- und Brustfellentzündung, im Falle von Krannhals eine tödliche Allgemeininfektion nach einem eitrigen Pleuraempyem. Speziell das Kindesalter weist dieser Infektion gegenüber nur eine schwache Widerstandsfähigkeit entgegen, doch auch hier finden wir gewöhnlich außerdem noch andere prädisponierende Momente in Form von hereditärer Lues, Magendarmerkrankungen etc. Die Untersuchungen von Kossel, Neumann, Manicatide, Finkel-

1) Vorgelegt der mathem.-naturwiss. Sektion der k. k. Akademie der Wissensch. zu Krakau in der Sitzung vom 6. Juli 1903.

stein, Nicholson, Williams und Cameron, Blum zeigen, daß diese *Pyocyaneus*-Infektionen im Kindesalter relativ oft vorkommen und sich prognostisch sehr ernst gestalten. Die Feststellung der ätiologischen Rolle des *Pyocyaneus* bei menschlichen Infektionen bietet gewisse Schwierigkeiten: in Fällen von Allgemein- resp. septischer Infektion kann wohl der Nachweis des *Bacillus intra vitam* im Blut und den inneren Organen in Reinkultur dazu berechtigen. Finden wir ihn dagegen im Sekret äußerer Wunden in Gesellschaft anderer pathogener Keime, so erhebt sich angesichts seiner Rolle als fakultativen Krankheitserregers die Frage, ob im gegebenen Falle seine Rolle aktiv ist, oder ob er nur als unschuldiger Saprophyt zu betrachten ist. In solchen Fällen scheinen die neueren biologischen Reaktionen berufen zu sein, das entscheidende Urteil zu fällen, indem sie das Vorhandensein einer Infektion durch Nachweis der seitens des Organismus stattgefundenen Reaktion zu eruieren erlauben. Wenn das Serum der betreffenden Individuen spezifische, agglutinierende, koagulierende oder bakterizide Eigenschaften aufweist, wenn es das Bordet-Gengou'sche Phänomen, antifermentative (v. Dungern, Simnitzky) oder antihämolytische Wirkungen zeigt, dann können wir selbst im Falle einer Mischinfektion unserem *Bacillus* eine pathogenetische Bedeutung zusprechen. Soviel mir aus der Literatur bekannt ist, haben sich bisher nur 2 Arbeiten mit dieser Seite des Problems beschäftigt. Im Jahre 1899 berichtet Escherich in seiner Arbeit über *Pyocyaneus*-Infektionen bei Säuglingen, daß er in 2 Fällen ein negatives Resultat der Agglutinationsprobe zu verzeichnen hatte; dazu möchte ich jedoch bemerken, daß weder das klinische Symptomenbild noch die Resultate der bakteriologischen Untersuchungen die Annahme einer *Pyocyaneus*-Infektion beweisen. In letzter Zeit haben Achard, Loeper und Grénet 3 Fälle mit positiver Reaktion beschrieben: einen Fall von Infektion nach Hämothorax (Agglutination $\frac{1}{40}$), eine Mischinfektion nach einer Pneumokokkenpleuritis (Aggl. $\frac{1}{100}$) und eine Wundinfektion einer Quetschwunde (Aggl. $\frac{1}{100}$). In 3 anderen Fällen, wo der *Bacillus* wahrscheinlich nur als Saprophyt auf Wunden vegetierte, gab die Reaktion ein negatives Resultat, Kontrolluntersuchungen und Serum von normalen Individuen gaben selbst bei $\frac{1}{10}$ negative Resultate, nur das Serum eines Typhuskranken gab positive Reaktion bei $\frac{1}{10}$, weshalb die Autoren die Verdünnung $\frac{1}{30}$ als unteren Grenzwert für spezifische Reaktionen annehmen.

Da ich zur Zeit mich mit der Differenzierung in der Gruppe der fluoreszierenden Bakterien befasse, benutzte ich gerne einen sich anbietenden Fall von „blauem Eiter“, um persönliche Erfahrung in diesem Punkt zu erwerben. Dem Primarius der chir. Abteilung des St. Lazarus-Spitals in Krakau, Wohlgl. H. Prof. Trzebicky, bin ich für die gütige Ueberlassung dieses Falles zu tiefem Dank verpflichtet.

Es folge in kurzen Worten die Krankengeschichte dieses Falles: Josef Z., 43 Jahre alt, Pr.-No. 5756, Abt. Pr.-No. 937, aufgenommen am 28. Dezember 1902. Der Patient gibt an, daß er sich mit einer Axt vor 4 Monaten den rechten Unterschenkel, dicht unterhalb des Kniegelenks verletzt hat. Es entstand eine Geschwulst, die rasch größer wurde, Rötung der Haut und starke Schmerzen an dieser Stelle sowie im Kniegelenk. Die Geschwulst wurde einigemal vom Arzte gespalten, wobei jedesmal blutig-eitrig Flüssigkeit sich entleerte. Die Geschwulst breitete sich trotzdem weiter aus, das Wundsekret wies seit 2 Monaten grüne Färbung auf. Gegenwärtig sind bedeutendes Schwächegefühl,

Abmagerung sowie intensive Schmerzen in der affizierten Extremität zu verzeichnen. Am 28. November 1902 wurden in Narkose tiefe Incisionen gemacht, Eiter entleert und die entstandenen Wunden tamponiert. Am 17. Dezember neuerliche Incisionen. Am 17. Januar 1903: Die Incisionswunden heilen schlecht und entleeren reichlichen grünlich verfärbten Eiter; der Allgemeinzustand recht elend. Am 23. Januar wird in Narkose die linke untere Extremität im Hüftgelenk exartikuliert (Dr. Juras), die Wunde drainiert und zusammengenäht; am selben Tage 6 Stunden nach der Operation tritt der Exitus ein. Der Fieberverlauf war meistens remittierend oder intermittierend. Die am 24. Januar vorgenommene Obduktion (Ass. Dr. K. Gliński) ergab völlig normale innere Organe, bis auf eine Spur von Verfettung der Nieren und eine auffallende Anämie des ganzen Körpers.

Bevor ich die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen wiedergebe, möchte ich noch ganz kurz über ein seltenes und bis jetzt unaufgeklärtes Phänomen berichten, das unser Fall darbot. Schon bei Gelegenheit einer Blutentnahme aus der Fingerbeere bei Lebzeiten des Kranken konnte ich, abgesehen von einer auffallenden Hydrämie, bemerken, daß die Erythrocyten sich in der kleinen Epruvette sogleich in Häufchen zu Boden senkten, wodurch ganz ungefärbtes Plasma über ihnen stehen blieb. Bei der Autopsie erschien das Blut in allen Gefäßen (besonders deutlich in den Hirngefäßen) als farblose Flüssigkeit, in der Haufen zusammengebackener Erythrocyten in Form von roten Punkten suspendiert waren. Das dem Herzen sowie den großen Gefäßen entnommene Blut ließ nach einer kurzen Weile in den Epruvetten 2 deutlich abgegrenzte Schichten unterscheiden, die des farblosen Serums sowie die der zusammengeballten Erythrocyten. Mikroskopisch sah man typische Haufen agglutinierter Erythrocyten, die selbst mechanisch auseinandergeschüttelt nach einer Weile wieder sich zu Haufen vereinigten. Wir haben hier also das Phänomen der Autoagglutination vor uns und zwar sowohl in dem bei Lebzeiten entnommenen wie auch postmortal im intravaskulären Blute. Ein eigentümliches Verhalten zeigte auch das Serum des Kranken gegenüber fremdem Blute (5-proz. Aufschwemmung in 5-proz. NaCl-Lösung); während das bei Lebzeiten aus einer Vesikatorblase entnommene Serum schwach isoagglutinierend wirkte, zeigte sich das bei der Autopsie erhaltene Serum gegenüber demselben Blut völlig inaktiv. Wenn wir annehmen, daß im lebenden Organismus Autoagglutination nicht eintreten kann, während sie nach dem Tode in den Gefäßen in höchst prägnanter Weise zu sehen war, dann wäre vielleicht die hervorgehobene Differenz darauf zurückzuführen, daß die Agglutinine des Serums bei der Autoagglutination post mortem absorbiert wurden, während intravital sich dazu keine Gelegenheit bot. Was in unserem Falle als Ursache des Auftretens dieses interessanten Phänomens zu betrachten ist, ob die starke Anämie oder aber toxische Wirkungen seitens der die Wunde infizierenden Keime, wird wohl schwer zu sagen sein. Die bisher bekannt gewordenen Fälle von Autoagglutination (Klein, Hayem, Reitmann, Obermayer) betreffen Patienten mit Hanotscher hypertrophischer Lebercirrhose, so daß sie kaum zur Erklärung des vorliegenden Falles herangezogen werden können. In letzter Zeit hat nun S. Flexner die Bedeutung solcher vitaler Autoagglutination für die Entstehung von hyalinen Thromben, die aus degenerierten agglutinierten Erythrocyten bestehen, hervorgehoben. Nach seiner Ansicht sollen solche Thromben besonders bei Infektionskrankheiten ent-

stehen, wo die im Blute kreisenden bakteriellen Toxine die Erythrocyten agglutinieren; auf diese Weise will er die bei Abdominaltyphus, Pneumonie, Diphtherie gefundenen Thromben entstanden wissen. Es ist natürlich zur Zeit sehr schwer, sich in dieser Frage zu äußern; in seinen eigenen Fällen scheint Flexner (nach den mir zugänglichen Referaten zu urteilen) keine Autoagglutination festgestellt zu haben, so daß seine Erklärung vor der Hand wohl Hypothese bleiben muß, um so mehr, als viele Erfahrungstatsachen dagegen zu sprechen scheinen. Wissen wir ja, daß Körper, die *in vitro* Blutkörperchen agglutinieren, sich im lebenden Blute ganz anders verhalten können, wie das durch die Beobachtungen von Lau an vegetabilischen, von Bongiovannini an normalen und von Kraus und Sternberg an spezifischen Häm-agglutininen bewiesen wird. Aus der Arbeit von Halban und Landsteiner wissen wir, daß *in vitro* ein Ueberschuß an agglutinierbarer Substanz die Agglutination hemmt; dieser Faktor ist es auch wahrscheinlich, der im Gefäßsystem keine oder nur eine minimale Hämagglutination zuläßt. Was speziell unseren Fall betrifft, so konnten hier bei der Autopsie keine Thromben gefunden werden, noch auch daran sich anschließende Folgeerscheinungen, trotzdem schon bei Lebzeiten Autoagglutination des Blutes *in vitro* konstatiert worden war.

Die bakteriologische Untersuchung des eitrigen Wundsekretes habe ich in unserem Fall zum erstenmal am 12. Januar 1903 vorgenommen; der dickliche, grün gefärbte geruchlose Eiter zeigte im mikroskopischen Bilde neben kernig und fettig degenerierten Leukocyten und körnigem Detritus eine gewisse Menge kurzer, dünner Stäbchen und spärliche, nicht charakteristische Kokken. Durch Plattenverfahren wurden aus diesem Eiter 2 Arten isoliert, weiße Eiterkokken und der *Pyocyanus*. Bei einer abermaligen Untersuchung des Wundsekretes am 20. Jan. 1903 fand ich im mikroskopischen Bilde neben den erwähnten Kokken und Stäbchen größere und dickere plasmolysierte Stäbchen, die sich durch Kultur als der Hofmann-Wellenhof'schen Pseudodiphtheriegruppe zugehörig erwiesen. Nunmehr will ich ganz kurz die Merkmale des isolierten *Pyocyanus*-Stammes anführen, dem ich besondere Aufmerksamkeit schenkte. Durch seine morphologischen sowie färberischen Merkmale (gram-negativ) entspricht er dem Typus, ebenso stimmen damit die Kulturen auf den üblichen Nährböden. Betreffs der biochemischen Eigenschaften möchte ich folgendes hervorheben: Milch wird nicht koaguliert, nur peptonisiert (unter 6 anderen von mir untersuchten Stämmen verhalten sich 5 ebenso, nur einer koaguliert sie auch), Nitrite werden von ihm denitrifiziert (Lehmann, Weissenfeld), Gelatine wird verflüssigt, koaguliertes menschliches oder Pferdeserum energisch peptonisiert. Bezüglich der chromogenen Funktionen will ich bemerken, daß er auf verschiedenen Nährböden Pyocyanin sowie Fluorescein produziert und das an Bouillon- oder Gelatinekulturen zu beobachtende Chamäleonphänomen charakterisiert den Stamm als der β -Varietät von Ernst zugehörig. Bevor ich die Schilderung der in unserem Falle vorgenommenen Agglutinationsversuche angehe, möchte ich mit einigen Worten einige technische Einzelheiten besprechen, die bei der Agglutination von fluoreszierenden Bakterien zu berücksichtigen sind. Wie schon von Acharid, Loeper und Grénet bemerkt wurde, ist diesen Bakterien eine ausgesprochene Neigung zur Pseudoagglutination (spontaner Sedimentierung) eigen, weshalb auch diese Autoren die Verwendung junger Bouillonkulturen befürworten, die zwecks Entfernung

event. vorhandener Flocken durch Fließpapier filtriert werden sollen. Bei meinen Untersuchungen hatte ich Gelegenheit zu beobachten, daß diverse Kulturen ein und desselben Stammes einmal spontane Niederschläge bildeten, das andere Mal keine, ohne daß irgend ein Grund dafür zu eruieren wäre; so genügen wahrscheinlich minimale Abweichungen in der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens speziell der Salze, um Sedimentierung hervorzurufen. Jedenfalls zeigen sich meistens junge (8—12-stündige) Bouillonkulturen homogen getrübt und weisen auch unter dem Mikroskope gewöhnlich keine Häufchen auf, so daß selbst ein Filtrieren unnötig erscheint. Oft gelingt es auch, tadellose Emulsionen von jungen Schrägagarkulturen zu erzielen. Der Agglutinationsprobe wurden folgende Stämme von fluoreszierenden Bakterien unterzogen: 1) *B. pyocyaneus* 7, ein vor 2 Jahren aus einer Phlegmone herausgezüchteter Laboratoriumstamm, 2) *B. pyocyaneus* Phl. 1 und 3) *B. pyocyaneus* 24, 1, von mir vor einem halben Jahre aus Phlegmoneneiter isoliert, 4) *B. pyocyaneus* Kura von Herrn Dr. R. Nitsch aus dem Wasser des Kura-Flusses (bei Baku) isoliert und mir gütigst überlassen, 5) *B. pyocyaneus* 15 aus unserem Fall stammend, 6) *B. fluorescens liquefaciens* 7, aus dem Institutsmuseum, 7) *B. fluorescens putitus* (*B. fluorescens non liquefaciens autorum*) ebenfalls ein Laboratoriumstamm, 8) *B. fluorescens* Czap. von Herrn Dr. M. Bernacinski aus dem Eiter bei einer Endometritis septica isoliert und mir gütigst überlassen, der durch seine Eigenschaften sich dem *B. fluorescens capsulatus* Pottien nähert. Die Ergebnisse der Agglutinationsversuche zeigt in übersichtlicher Weise folgende Tabelle:

+ positive Reaktion, ++ stark positive, Sp. Spur, — negative Reaktion.

Stamm	Serumverdünnung					
	$1/2$	$1/10$	$1/30$	$1/50$	$1/100$	$1/200$
<i>B. pyocyaneus</i> 7	+	+	+	+	+	—
<i>B. pyocyaneus</i> Phl. 1	+	+	—	—	—	—
<i>B. pyocyaneus</i> 24, 1	+	+	—	—	—	—
<i>B. pyocyaneus</i> K.	+	—	—	—	—	—
<i>Fluorescens liqu.</i> 7	Sp.	—	—	—	—	—
<i>Fluorescens liqu.</i> 7	++	++	++	++	++	+
<i>Fluorescens put.</i> 7	+	+	—	—	—	—
<i>B. fluorescens</i> Czap.	+	+	—	—	—	—

Bei einer eingehenden Analyse dieser Ergebnisse fällt uns vor allem die Tatsache auf, daß das Serum unseres Patienten, das die Laboratoriumstämme vom *Pyocyaneus* und *Fluorescens liqu.* energisch agglutiniert, sich gegenüber dem aus dem Kranken gezüchteten Stamm inaktiv erweist. Diese Erscheinung läßt sich ungezwungen in Zusammenhang bringen mit einer ganzen Reihe von Tatsachen, die von diversen Forschern bezüglich des Verhaltens von frisch aus dem menschlichen Organismus gezüchteten Typhusstämmen erhoben wurden und weiter unten in Zusammenhang mit anderen diesbezüglichen Erscheinungen besprochen werden sollen. Derselbe Grund wird wohl bei der geringen Agglutinabilität der Stämme Phl. 1 und 24, 1 vorliegen, die ungefähr ein halbes Jahr vor Anstellung der Proben aus Wundsekret reingezüchtet und seither nur einigemal künstliche Nährböden passiert haben. Was den aus Wasser reingezüchteten Stamm K. anbelangt, muß ich es vorderhand unentschieden lassen, ob bei ihm die minimale Agglutina-

bilität mit der von einigen Untersuchern gefundenen geringen Agglutinabilität von aus dem Wasser gezüchteten Typhusstämmen in eine Reihe zu setzen ist, oder aber ob er nicht vielleicht als biologisch vom echten *Pyocyaneus* differenter Stamm zu betrachten ist, obzwar er sonst mit ihm in allen Merkmalen übereinstimmt. Die beobachtete Agglutination der fluoreszierenden Bakterien ist wohl am besten als sogenannte „Gruppenagglutination“ zu deuten, wie sie für die Typhus-Coli-Gruppe (Pfaundler, Nocard, Durham, de Nobele u. a.) sowie für Gruppe der säurefesten Bakterien (Courmont und Descos) bereits bekannt ist, und mit deren Feststellung im Bereiche der *Fluorescentes*-Gruppe sich eine Arbeit befaßt, die ich binnen kurzem zu publizieren hoffe. Die frappante Tatsache, daß der *Fluorescens liquefaciens* 7 stärker agglutiniert wird, als des *Pyocyaneus* 8 bedarf allenfalls noch einer speziellen Erklärung; man wird dabei zu berücksichtigen haben, daß auch der Stamm *Pyocyanens* 7 erst vor 2 Jahren aus dem menschlichen Organismus auf künstliche Nährböden gebracht wurde und seither nur jeden Monat eine Passage, d. i. ca. 24 Passagen im ganzen, durchgemacht hat, so daß auch er vielleicht noch nicht die maximale Agglutinabilität erreicht hat, während der saprophytische *Fluorescens* sie wohl normalerweise besitzt. Daß der aus unserem Patienten gezüchtete Stamm *Pyocyaneus* 15 tatsächlich wenig agglutinabel ist, beweist weiterhin noch die Beobachtung, daß er vom Serum eines gegen den *Pyocyaneus* 7 immunisierten Kaninchen, das den homologen Stamm bei $\frac{1}{100}$ deutlich agglutiniert, in den Verdünnungen $\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{10}$ nur spurweise agglutiniert wird. Die Prüfung des Serums unseres Patienten auf etwaige koagulierende (präzipitierende) Wirkung gegenüber Kulturfiltraten von *Pyocyaneus* 7 und *Fluorescens liqu.* 7 gab ein negatives Resultat, trotzdem die betreffenden Filtrate mit entsprechenden Kaninchenimmuneris zusammengebracht ganz deutliche Niederschläge gaben, also präzipitable Substanz wohl enthielten. In letzter Zeit hat Beljajew festgestellt, daß nur manche Sera von Typhuskranken spezifische Niederschläge geben und zwar unabhängig von ihrem Agglutinationstitre.

Unserer Stamm, der *Pyocyaneus* 15, zeigte auch in anderer Hinsicht ein besonderes Verhalten; in den Präparaten, in denen das Agglutinationsvermögen des frischen Serums unseres Patienten in der Verdünnung $\frac{1}{2}$ im hängenden Tropfen untersucht wurde, konnte ich eine auffallende Erscheinung beobachten. Nach 2-stündigem Aufenthalt im Thermostaten waren in den Präparaten aller anderen oben aufgezählten Stämme nur spärliche, undeutliche, schwach lichtbrechende Schatten von Stäbchen, die Mehrzahl der Stäbchen war verschwunden; nach 24 Stunden blieb das Bild unverändert, erst nach 48 Stunden trat sekundäre Bakterienvermehrung ein, die oft in bakteriziden Versuchen beobachtet wird. Das Präparat des Stammes *Pyocyaneus* 15 zeigte nach 2 Stunden normale, wohlerhaltene Stäbchen, hie und da zu minimalen Häufchen vereinigt, nach 24 Stunden eine kolossale Vermehrung der Bakterien, die mit einem dichten Rasen das ganze Präparat ausfüllen: Eine vollkommene Bestätigung dieser Befunde gab der bakterizide Versuch nach der Buchnerschen Plattenmethode ausgeführt; während die Platten aller anderen Stämme eine ausgesprochene bakterizide Wirkung des Serums zeigten, konnte bei unserem Stamme von Anfang eine deutliche Vermehrung beobachtet werden. Ohne vorläufig an die theoretische Deutung dieser Tatsache heranzutreten, die übrigens weiter

unten ihren Platz finden soll, möchte ich noch ganz kurz die wichtigsten Eigenschaften unseres Falles rekapitulieren: wir haben es hier mit einer Wund-Mischinfektion zu tun, das Serum des Patienten agglutiniert in spezifischer Weise den *Pyocyaneus*, außerdem zeigt das Blut das Phänomen der Autoagglutination; der aus dem Kranken herausgezüchtete Stamm zeigt sich resistent gegenüber der Agglutinationswirkung des hämologen Serums sowie gegenüber der bakteriziden Wirkung menschlichen Serums.

II.

Ueber die Unempfindlichkeit der aus dem Organismus gezüchteten Typhusbacillen gegenüber der bakteriziden Wirkung menschlichen Serums.

Ausgehend vom ungewöhnlichen Verhalten des *Pyocyaneus*-Stammes im obigen Falle, beschloß ich daraufhin, frisch aus dem Organismus gezüchtete Typhusstämme zu untersuchen. Die oben beobachtete Unempfindlichkeit gegenüber der bakteriziden Wirkung des Serums war allem Anschein nach auf eine Anpassung der Bakterien an diese Wirkung im Verlaufe einer länger dauernden Infektion zurückzuführen. Um nun festzustellen, ob diese Erscheinung allgemeine Geltung haben dürfte, schien es geboten, eine länger dauernde Infektion zu wählen, die den Bakterien zu einer derartigen Anpassung Gelegenheit geben könnte, andererseits aber eine Infektion, deren Erreger für die bakterizide Wirkung menschlichen Serums normalerweise zugänglich sind. Der menschliche Abdominaltyphus erfüllt beide Bedingungen und bietet dabei die Möglichkeit, die Erreger auf vielerlei Weise aus dem infizierten Organismus reinzuzüchten, wie dies zahlreiche neuere Arbeiten beweisen, die die Isolierung der Typhusbacillen aus der Roseola, aus Blut und Harn zum Gegenstand haben.

Wir besitzen gegenwärtig 3 Methoden des Nachweises von bakteriziden Wirkungen; die von Buchner eingeführte Plattenmethode, die es erlaubt, die Versuchsergebnisse (übrigens ziemlich ungenau) ziffermäßig wiederzugeben, besitzt den Nachteil, daß sie zur Serumwirkung noch osmotische Störungen hinzufügt, bedingt durch das Uebertragen der Bakterien auf einen neuen Nährboden. Die von Pfeiffer eingeführte und vortrefflich bearbeitete Methode, die das Peritoneum als Reaktionsmedium benutzt, erfordert große Tieropfer und außerdem führt sie einen nicht ganz gleichmäßig reagierenden und höchst komplizierten Faktor ein — den lebenden Tierkörper. Praktisch sehr bequem und leicht ausführbar erscheint mir dagegen die Methode der Beobachtung im hängenden Tropfen, die, zuerst von Metchnikoff und Bordet zu diesem Zweck angewandt, seither wie ich glaube, ungerechterweise von späteren Forschern vernachlässigt wurde. Ebenso wie die Pfeiffersche Methode, erlaubt sie den Verlauf der morphologischen Veränderungen, die wir als Bakteriolyse bezeichnen, genau zu verfolgen, mit beiden Methoden hat sie gemein, die Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse zu ermöglichen.

Wie aus den Untersuchungen zahlreicher Forscher bekannt ist, wirken verschiedene normale Sera, darunter speziell das menschliche Serum, stark bakterizid auf Typhusbacillen, und das Pfeiffersche Phänomen gibt dafür den morphologischen Ausdruck ab. Zur Beschreibung dieses Phänomens bei Typhusbacillen, die von Pfeiffer, Kollé und Fränkel, sowie von Radziewsky gegeben wurde, möchte

ich folgende eigenen Beobachtungen hinzufügen, die ich in meinen Versuchen sammeln konnte. Im Falle einer besonders starken Serumwirkung sehen wir im Präparate Häufchen die aus undeutlich granulierten, schwach, lichtbrechenden Massen bestehen, in den Häufchen stellenweise Kügelchen deren Durchmesser die Breite eines Typhusstäbchens kaum oder nur unmerklich übertrifft, daneben isolierte, kaum sichtbare Schatten von Stäbchen mit zerfransten wie angenagten Konturen, zuweilen auch nur kleinste Körnchen als Ueberbleibsel der Schatten. Bei schwächerer Wirkung, d. i. bei langsamerem Verlaufe der Reaktion, sehen wir nach $\frac{1}{2}$ —1 Stunde zahlreiche stark lichtbrechende Kügelchen verschiedener Größe, isoliert oder zu Häufchen vereinigt, zuweilen Stäbchen, die an einem Ende solche Kügelchen tragen oder die es noch in ihrem Innern an einem der Pole einschließen. Was ist nun das weitere Schicksal dieser Gebilde? Die Formen des granulösen Zerfalls scheinen der Ausdruck des endgültigen Absterbens der betroffenen Bakterien zu sein; in den Präparaten, die den ersten Typus aufweisen, tritt fast nie Vermehrung der Bakterien ein, selbst bei einer bis zu 72 Stunden dauernden Beobachtung; nur ausnahmsweise sehen wir aus einem oder einigen Stäbchen neues Wachstum entstehen in Form von Fäden oder Knäueln. Es unterliegt auch keinem Zweifel, daß ein Teil dieser Gebilde aus dem Präparate wenigstens für unser Auge verschwindet; in Fällen von starker Serumwirkung bildet die Zahl der nach 30 Minuten sichtbaren körnig zerfallenen Stäbchen und Schatten nur einen Bruchtheil der ursprünglich vorhanden gewesenen Bakterien, was aus dem Rest geworden ist, ist schwer zu sagen, jedenfalls bleibt aber ein gewisser Teil der Schatten auch nach Ablauf von 72 Stunden noch unverändert. Von den Kügelchen kann man mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit annehmen, daß sie wenigstens in den ersten Stadien immer noch lebensfähig sind; indem zwar manche im Präparate verschwinden, andere aber zu Stäbchen und Fäden heranwachsen. In diesem Punkte bestätigt die morphologische Beobachtung die Ergebnisse der Plattenmethode und rückt sie zum Teil unserem Verständnis näher; es wurde vielfach beobachtet, daß man bei Einwirkung eines bakteriziden Serums nach einigen Stunden eine sterile Platte bekommt, während nach 24 Stunden wieder reichliches Wachstum eingetreten ist. Wir müssen uns also vorstellen, daß die spärlichen, nach einigen Stunden am Leben gebliebenen zu Kügelchen umgewandelten Bakterien, da sie schon stark geschädigt sind, die neuerliche osmotische Schädigung beim Plattengießen nicht mehr straflos aushalten können — daher die sterile Platte — während sie in ihrem Milieu belassen sich noch erholen und weiterhin auch vermehren können. Wenn man bedenkt, daß das Auftreten der Kügelchen gerade bei schwächerer bakterizider Serumwirkung auftritt (oft bei geringeren Serumkonzentrationen) und daß sie zum Teil wenigstens zweifellos lebensfähig sind, wird man wohl am besten tun, wenn man in Uebereinstimmung mit Radziewski ihre Entstehung als Ausdruck einer gegenseitigen Einwirkung der bakteriziden Körper sowie des noch lebenden Bakterienprotoplasmas auffaßt. Andererseits jedoch ist ein Teil der Kügelchen dem Tode verfallen und erleidet eigentümliche morphologische Veränderungen, die nicht leicht zu deuten sind. Diese kleinen, $1-2 \mu$ im Durchmesser erreichenden Kügelchen dehnen sich übermäßig aus bis zur Größe von Leukocyten und darüber, ohne daß dabei die Schärfe der Konturen leidet (dadurch unterscheiden sie sich von den von A. Fischer bei der Plasmoptyse beschriebenen auf-

geblähten Kugeln) oder daß ihr Inhalt weniger stark lichtbrechend würde. Manche von ihnen enthalten in ihrer Mitte oder gegen die Peripherie zu matte scharfbegrenzte kuglige Räume von 1—3 μ Durchmesser, die an Dellen von Erythrocyten erinnern, bei anderen grenzt dieser Raum an die Peripherie der Kugel, wodurch ungefähr das Bild von einem Malaria-Halbmond mit erhaltenem Kontur des Erythrocytenschattens entsteht, bei anderen wieder gibt es 2—3 solcher Räume, deren Konturen einander schneiden. Diese großen Gebilde, die innerhalb ca. 24 Stunden aus den kleinen Kügelchen entstehen, erleiden dann während der weiteren Beobachtung keinerlei Veränderungen. Sie entstehen wahrscheinlich durch Aufquellen aus den kleinen Kügelchen; welche speziellen Bedingungen dazu erforderlich sind, kann man vorderhand nichts sagen, ganz allgemein aber wäre zu bemerken, daß man sie selten zu sehen bekommt, dann aber in großer Menge. Da wir bisher in der Literatur nur farbige Reproduktionen der morphologischen Veränderungen bei der Bakteriolyse in den Arbeiten von Metchnikoff und Radziewsky besitzen, versuchte ich mittels der Photographie einige solche charakteristische Bilder zu fixieren. Gefärbte Präparate von hängenden Tropfen erzielte ich nach der Methode, die in meiner Arbeit über die Fadenreaktion angegeben ist; die lufttrockenen Deckgläser fixierte ich stark in der Flamme, färbte mit gewöhnlicher Methylenblaulösung oder längere Zeit mit verdünntem Karbolfuchsin, sodann spülte ich energisch mit Wasser ab. Auf diese Weise gelingt es, eine ziemlich starke und gut differenzierte Färbung der Bakterien und ihrer pathologischen Formen zu erzielen, während der Hintergrund ganz ungefärbt oder nur ganz schwach gefärbt herauskommt.

Die wohl gelungenen Photogramme verdanke ich der geübten Hand meines hochverehrten Chefs, Herrn Prof. O. Bujwid, dem ich für seine freundliche Mühewaltung auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank abstatte. Ich möchte noch bemerken, daß der bei starker Serumwirkung auftretende körnige Zerfall der Stäbchen nach dieser Methode kaum darzustellen ist; beim Fixieren der Präparate verschwindet der Rest der Struktur und es bleiben nur amorphe, schlecht begrenzte und schlecht färbbare Schollen. In diesem Falle wie auch zur Reproduktion mancher Strukturdetails der oben beschriebenen großen Kugeln wäre wohl die Photographie in situ des ungefärbten Präparates heranzuziehen. Der von A. Fischer erhobene Einwand, daß beim Trocknen des hängenden Tropfens sekundäre osmotische Prozesse und als ihr Ausdruck auch morphologische Veränderungen auftreten, trifft für meine Präparate nicht zu, wo ich solche Veränderungen nicht beobachten konnte. Indem ich zu den Einzelheiten der Technik übergehe, will ich bemerken, daß zu den bakteriziden Versuchen immer 18—24-stündige Bouillonkulturen verwendet wurden und die Tatsache, daß sie ein Drittel oder die Hälfte des Volumens der Probe ausmachten, erlaubt die Annahme, die beobachteten Veränderungen seien auf Hungerzustände der Bakterien zurückzuführen, von vornherein auszuschließen. Das menschliche Serum, dessen bakterizide Wirkung untersucht wurde, entnahm ich steril Vesikatorblasen und bewahrte es bei niedriger Temperatur auf, wobei die bakterizide Kraft sich innerhalb der ersten 48 Stunden ungefähr gleich erhielt. Bei jedem Experiment wurde eine Kontrolle angestellt, wo zur Bouillonkultur physiologische NaCl-Lösung zugefügt wurde; in diesen Proben vermehrten sich die Bakterien ganz beträchtlich, ohne Degenerationsveränderungen aufzuweisen. Was die zu den Experimenten her-

angezogenen Typhusstämme anbelangt, wurde der als Kontrolle dienende Stamm Ty. I, den ich dem liebenswürdigen Entgegenkommen des Herrn Prof. R. Paltauf und des Herrn Doc. K. Sternberg in Wien verdanke, seit einer Reihe von Jahren auf künstlichen Nährböden in der Prosektur des Rudolfsitals in Wien fortgezüchtet. 4 andere Stämme sind von mir selbst aus Typhuskranken isoliert worden und zwar 3 aus der Roseola nach Neufeld-Schmiedicke, der 4. aus dem Blut nach der Methode von Castellani-Courmont (die Stämme: Häusler Ros. 2, Kosowski Ros. 2, Pachlowski R. 1, Ptak Kr. 1). Alle diese Stämme wurden den von Neufeld angegebenen Stichproben unterzogen und zeigten sich dabei als typische Typhusstämme. Was ihre biologische Charakteristik betrifft, habe ich unterlassen, die Pfeiffer'sche Reaktion mit ihnen anzustellen aus Gründen, die weiter unten erörtert werden sollen. Die Agglutinationsprobe, zu der ein Immunserum von einem gegen den Ty. I immunisierten Pferd herangezogen wurde, ergab für die diversen Stämme folgende Grenzwerte: Ty. I $\frac{1}{30000}$ bis $\frac{1}{50000}$, Ty. H. Ros. 2 bei $\frac{1}{100}$ negative Reaktion, Ty. Kos. Ros. 2 $\frac{1}{8000}$, Ty. Ptak Kr. 1 $\frac{1}{2000}$. Wir sehen also in Uebereinstimmung mit einer ganzen Reihe von Autoren, daß frisch aus dem kranken Organismus herausgezüchtete Stämme sich viel schwerer agglutinieren lassen, als lange auf künstlichen Nährböden fortgezüchtete. Die bakteriziden Versuche wurden in der Weise angestellt, daß zu einer konstanten Menge Bouillonkultur und zwar zu einer kleinen Oese die gleiche Menge unverdünnten oder entsprechend verdünnten frischen menschlichen Serums zugesetzt wurde und zwar in 2 Parallelreihen, in denen das betreffende Serum einmal auf den Stamm Ty. I, das andere Mal auf den untersuchten aus dem infizierten Organismus gezüchteten Stamm einwirkte. Die hängenden Tropfen wurden 3 Stunden bei 37°, sodann bis 48—72 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten und während dieser Zeit wurde einige Mal der vorliegende Befund notiert. Der Verlauf dieser Versuche läßt sich im allgemeinen dahin resumieren, daß der Stamm Ty. I unter der Einwirkung der diversen Sera eine prägnante Bakteriolyse aufwies, die Bakterien sich vermehrungsunfähig erwiesen, oder aber daß die Vermehrung erst nach Ablauf von 24 bis 48 Stunden einsetzte. Im Gegensatz hierzu waren die aus dem Organismus frisch gezüchteten Bakterien entweder völlig resistent gegenüber der bakteriziden Serumwirkung und vermehrten sich von Anfang an sehr üppig, indem sie unter der gleichzeitigen Einwirkung der Agglutination das Bild der Fadenreaktion gaben oder aber traten die Erscheinungen der Bakteriolyse nur in den stärksten Serumkonzentrationen auf und zwar in sehr beschränktem Maße. Beispiels halber führe ich hier aus einer größeren Anzahl ähnlicher Befunde das Protokoll eines solchen Versuches an, in dem das Serum von einem Typhuskranken einerseits auf den Stamm Ty. I, andererseits auf den Stamm H. Ros. 2 einwirkte (s. Tabelle p. 749).

Aehnliche Resultate ergaben sich bei Verwendung zahlreicher Sera von Gesunden wie von Kranken, darunter vorwiegend Typhuskranken. Um zu erfahren, ob die in diesen Versuchen beobachtete Unempfindlichkeit der aus dem Organismus gezüchteten Stämme gegenüber der bakteriziden Wirkung menschlicher Sera streng spezifischer Natur ist, d. h. sich nur menschlichem Serum gegenüber äußert oder auch gegenüber Seris von anderen Tierarten, untersuchte ich die Wirkung zahlreicher normaler Kaninchen- und Pferdesera (darunter auch einiger Sera von Diphtherie-

Ser.-Verd.	Zeit	Stamm Ty. I	Stamm H. Ros. 2
1/2	75 Min.	spärliche Häufchen von undeutlich granulierter, verwischter Struktur	Fadenreaktion
	3 Std.	wie vorhin	zahlreiche, große, makroskopisch sichtbare Knäuel
	5 „	wie vorhin	die Knäuel immer größer, große Fäden
	9 „	die Häufchen etwas deutlicher granuliert, darin deutliche Kügelchen	wie vorhin
	12 „	wie vorhin, mehr Häufchen	kolossale Knäuel
	20 „	wie vorhin	wie vorhin
	30 „	deutliche Häufchen aus Kügelchen und Körnchen bestehend, Schatten von zerfallenen Stäbchen, normale Stäbchen nicht zu sehen, keine Vermehrung	immense Knäuel
	42 „	wie vorhin	wie vorhin
70 „	wie vorhin	wie vorhin	
1/4	75 Min.	Häufchen von undeutlich granulöser Struktur, sehr prägnantes Pfeiffersches Phänomen	Agglutinat, Anfang der Vermehrung
	3 Std.	wie vorhin	zahlreiche große Knäuel, makroskopisch sichtbar
	5 „	aus den Häufchen wachsen kleine Fäden heraus	kolossale Knäuel, große Fäden
	9 „	neben den Häufchen kleine und mittlere Knäuel	wie vorhin
	12 „	große Knäuel	wie vorhin
	20 „	schöne, makroskopisch sichtbare Fadenreaktion	wie vorhin
	30 „	wie vorhin; hie und da in den Fäden Körnchen und Kügelchen	kolossale Knäuel
	42 „	wie vorhin; viele bewegliche Bakterien	wie vorhin
70 „	wie vorhin	wie vorhin	
1/10	75 Min.	Häufchen von granulöser Struktur, sehr prägnantes Pfeiffersches Phänomen	Agglutination, Anfang von Vermehrung
	3 Std.	sehr prägnantes Pf. Phänomen, Anfang von Vermehrung	makroskopisch sichtbare Fadenreaktion, zahlreiche isolierte Bakterien
	5 „	aus den agglutinierten Häufchen wachsen Fäden heraus, viele freie Fäden	kolossale Knäuel, Fäden
	9 „	kleine Knäuel, viele isolierte Bakterin und Fäden	wie vorhin
	12 „	mittlere Knäuel, viele Fäden und Bakterien zum Teil beweglich	wie vorhin
	20 „	schöne Fadenreaktion	wie vorhin
	30 „	wie vorhin	immense Knäuel
	42 „	wie vorhin	wie vorhin
70 „	wie vorhin	wie vorhin	

pferden) auf diese Stämme. Es zeigte sich, daß die Resistenz sich auch auf die Wirkungen dieser Sera erstreckt. Als Beispiel führe ich folgende Versuche an:

Versuch 5. Februar 1903.
Normales Kaninchenserum No. 3.

Ser.-Verd.	Zeit	Stamm Ty. I	Stamm H. Ros. 2
1/2	1 Std.	Kleine Häufchen von verwischter granulöser Struktur, Schatten von Stäbchen, daneben gut erhaltene Stäbchen, zum Teil beweglich.	Schwache Agglutination, isolierte gut erhaltene Stäbchen, zum Teil beweglich.
	6 „	Wie vorhin, die vorhin intakten Stäbchen sind stark körnig degeneriert, keine Vermehrung ist eingetreten.	Schwache Agglutination, dichter Rasen gut erhaltener, zum Teil beweglicher Stäbchen.
	17 „	Wie vorhin, ausnahmsweise sind gut erhaltene Stäbchen zu sehen, keine Vermehrung.	Wie vorhin.

Versuch 5. Februar 1903.
Pferdeserum No. 34.

Ser.-Verd.	Zeit	Stamm Ty. I	Stamm H. Ros. 2
1/2	1 Std.	Häufchen von verwischter, granulöser Struktur, Schatten von Stäbchen, daneben unbewegliche, gut erhaltene Stäbchen.	Schwache Agglutination, isolierte unbewegliche, gut erhaltene Stäbchen.
	6 „	Häufchen von verwischter, granulöser Struktur, körnig degenerierte Fäden, viele isolierte Kügelchen.	Makroskopisch sichtbare Fadenreaktion, kolossale Knäuel, viele isolierte Kügelchen.
	17 „	Wie vorhin, keine Vermehrung.	Immense Knäuel, an den Fäden hier und da körnige Degeneration.

Wie aus dem letzten Versuch zu ersehen ist, muß die Resistenz nicht immer so vollständig sein, wie die Versuche mit menschlichem Serum sie gezeigt haben. Namentlich bei Verwendung von Pferdeserum habe ich einigemal feststellen können, daß auch der aus dem Organismus gezüchtete Stamm sich der bakteriziden Serumwirkung zugänglich erwies, wenn auch in geringerem Maße als der Laboratoriumsstamm. Als Beleg dafür möge folgendes Protokoll dienen:

Versuch 5. Februar 1903.
Pferdeserum No. 17.

Ser.-Verd.	Zeit	Stamm Ty. I	Stamm H. Ros. 2
1/2	2 Std.	Häufchen von verwischter, granulöser Struktur, Schatten von Stäbchen.	Schwache Agglutination, die Stäbchen meistens granulös degeneriert.
	4 „	Wie vorhin.	Neben dem körnigen Häufchen kurze Fäden körnig entartet.
	6 „	Wie vorhin, spärliche kurze Fäden körnig entartet.	Wie vorhin.
	15 „	Spärliche, kaum sichtbare Kügelchen und Körnchen, sonst leeres Gesichtsfeld.	Kleine Knäuel und Fäden deutlich körnig entartet.
	42 „	Wie vorhin.	Kolossale Knäuel.

Auf Grund dieser Beobachtungen scheint es, daß die Resistenz der aus dem menschlichen Organismus gezüchteten Stämme insofern spezifisch ist, als sie gegenüber menschlichem Serum vollständiger ist, als gegenüber Seris anderer Tierarten. Daß diese Resistenz nur relativ ist, d. h. quantitativ begrenzt, wird auch durch eine andere Reihe von Beobachtungen bewiesen. Dank den Arbeiten von Pfeiffer und Kollé, Gieorgiewski, Widal und Le Sourd wissen wir, daß schon im Verlaufe des Typhus die Produktion von spezifischen Immunkörpern beginnt, die in den ersten Wochen der Rekonvaleszenz ihren Höhepunkt erreicht und die normale bakterizide Kraft des Serums erhöht. Die Untersuchung von Seris, die gegen Ende der Typhuserkrankung oder in der Rekonvaleszenz entnommen würden, in Bezug auf ihre Wirkung auf unsere Stämme hat ergeben, daß diese Stämme sich ihrer Wirkung zugänglich zeigen, doch um so viel weniger, als der Laboratoriumstamm. daß zur Erreichung der Wirkung stärkere Serumkonzentrationen nötig erscheinen, als bei jenem. Folgendes Beispiel mag das am besten erläutern:

Versuch 21. Februar 1903.

Ser.-Verd.	Zeit	Stamm Ty. I	Stamm Ptak Kr. 1
$\frac{1}{2}$	90 Min.	Schatten von Stäbchen, Häufchen von undeutlicher, körniger Struktur, erhaltene Stäbchen selten.	Schatten von Stäbchen, Häufchen von undeutlicher körniger Struktur, spärliche, erhaltene Stäbchen.
	4 Std.	Wie vorhin.	Wie vorhin.
	6 „	Wie vorhin.	Wie vorhin.
	20 „	Wie vorhin, keine Vermehrung.	Ein Netzwerk verschlungener, gut erhaltener Fäden, kompakte Haufen.
$\frac{1}{4}$	90 Min.	Schatten von Stäbchen, Kügelchen, Häufchen von verwischter, körniger Struktur, gut erhaltene Stäbchen selten.	Unvollständige Agglutination, gut erhaltene, meist unbewegliche Stäbchen.
	4 Std.	Wie vorhin.	Unvollständige Agglutination, starke Vermehrung.
	6 „	Wie vorhin.	Ein dichtes Netzwerk kurzer, gut erhaltener Fäden.
	20 „	Einige kleine Knäuel, sonst wie vorhin.	Dichtes Netzwerk verschlungener Fäden.

Es wird hier am Platze sein, einem Einwurf zu begegnen, der möglicherweise erhoben werden könnte, daß nämlich die Resistenz der aus dem Organismus frisch gezüchteten Stämme auf einer Besetzung ihrer Rezeptoren für bakterizide Zwischenkörper oder nach der Nomenklatur von Centanni auf einer „Stomosierung der Stomiten“ beruhen könnte. Dem ist entgegenzuhalten, daß die spärlichen Bacillen, die sich in einer Roseole oder in einigen Kubikcentimetern Blut finden, von der vollentwickelten Kultur durch eine Reihe von Generationen getrennt sind, wodurch die Einwirkung des obenerwähnten Faktors ausgeschaltet wird. Ueberdies wurde der aus dem Blute gezüchtete Stamm nicht in Originalkultur, sondern in den davon abgeleiteten Generationen zu den Versuchen verwendet, um den Einfluß des in der Originalkultur enthaltenen Serums zu eliminieren; in den Originalkulturen aus Roseolen ist diese Beimischung so verschwindend klein, daß sie ohne weiteres vernachlässigt werden darf. Endlich sei noch bemerkt, daß Kontroll-

untersuchungen mittels der Plattenmethode mit den obigen ganz identische Resultate ergaben.

III.

Allgemeine Bemerkungen.

Wir sahen oben, daß ein *Pyocyaneus*-Stamm sowie einige frisch aus dem Organismus gezüchtete Typhusstämme sich mehr oder weniger resistent gegenüber der agglutinierenden und bakteriziden Wirkung des Serums erweisen. Ich will nun, gestützt auf eine Reihe von Tatsachen, die von verschiedenen Forschern beobachtet wurden, diese Erscheinungen erklären und ihre Bedeutung für die Pathologie sowohl als auch für die Immunitätslehre entsprechend würdigen.

Die variierende Agglutinabilität diverser Typhusstämme hat seit der Entdeckung der Agglutination die Aufmerksamkeit vieler Untersucher auf sich gezogen. Achard und Bensaude, Kolle, Johnston und McTaggard, Van de Velde, Foerster heben diese Erscheinung hervor, ohne eine theoretische Erklärung dafür zu versuchen. Mills behauptet, daß die Schnelligkeit, mit der diverse Stämme von demselben Serum agglutiniert werden, zu ihrer Virulenz in einem umgekehrten Verhältnis steht; da wir nun wissen, daß frisch aus dem Organismus kommende Stämme gewöhnlich am virulentesten sind, und daß sie bei fortgesetzter Passage auf künstlichen Nährböden an Virulenz einbüßen, wäre die Beobachtung von Mills dahin zu deuten, daß frisch aus dem Organismus gezüchtete Stämme sich am schwersten agglutinieren lassen. Diese Behauptung findet ihre Bestätigung in zahlreichen Beobachtungen: Rodet stellte an drei aus Typhusmilzen gezüchteten Stämmen fest, daß diese Stämme, unmittelbar nach der Isolierung inagglutinabel oder schwach agglutinabel, nach einer Reihe von Monaten (8—12) sich vom Immuneserum normal agglutinieren ließen. Ein ähnliches Verhalten gegenüber Coli-Immuneserum beobachtete Rodet bei diversen, aus Typhusstühlen gezüchteten Coli-Stämmen. Ebenso sah Tarchetti bei frisch aus Typhusmilzen oder Typhusstühlen gezüchteten Stämmen geringe Agglutinabilität. Smith und Tenant beschreiben zwei aus Typhusmilzen isolierte Stämme, die sich als wenig agglutinabel erwiesen, während die Tatsache, daß durch Immunisierung mit ihnen typisches Typhusserum erzielt werden konnte, sie unzweideutig als authentische Typhusstämme erscheinen läßt. Horton Smith sowie Rehns isolierten ähnliche Stämme aus Typhusmilzen sowie aus Mesenterialdrüsen, Remlinger aus einem Pleuraexsudat, McWeeney aus der Gallenblase. Sacquépée züchtete aus 5 Typhusmilzen Stämme, die ursprünglich schwach agglutinabel nach einigen Monaten normale Agglutinabilität wiedererlangten. Aehnliche Beobachtungen finden wir bei Nicolle und Trénel, Horrocks und P. Th. Müller. Bancel isolierte aus 3 posttyphösen Abscessen inagglutinable Typhusstämme, die nach 6—11monatlicher Passage auf künstlichen Nährböden normale Agglutinabilität aufwiesen. Unter 35 aus dem Blute von Typhuskranken gezüchteten Stämmen fanden Courmont und Bancel 7 vollkommen inagglutinable, 24 schwach und nur 4 normal agglutinable; in der folgenden Generation stieg die Agglutinabilität successive bis zum Normalwert. Andererseits hat eine ganze Reihe von Untersuchern aus typhusverdächtigen Wässern Stämme isoliert, die sich von authentischen Typhusstämmen nur durch ihre Inagglutinabilität (zuweilen auch durch das Wachstum auf Kartoffeln) unterschieden; ich nenne hier nur die Beobachtungen von Rodet, Remlinger und

Schneider, Kister, Rémy, Nicolle und Spillmann, Vaillard, Houston, Sacquépée. Endlich haben bezüglich der Cholera vibrios Pfeiffer und Kolle festgestellt, daß virulente, d. i. oft durch den Tierorganismus durchgeschickte Stämme 70—100mal weniger agglutinabel sind als avirulente, seit längerer Zeit auf künstlichen Nährböden fortgezüchtete. Ueber ähnliche Erscheinungen bei Staphylokokkenstämmen berichten in letzter Zeit Kolle und Otto, bei Pneumokokken Karwacki. Die Ursache der geringen Agglutinabilität der bisher besprochenen Stämme kann verschieden sein. Was die aus unserer Umgebung gezüchteten Stämme anbelangt, so kommen dabei recht verschiedenartige Faktoren in Betracht.

Tarchetti berichtet, daß ein auf Glycerinbouillon mit steigendem Sodazusatz gezüchteter Stamm nach 12 Generationen eine deutlich verminderte Agglutinabilität zeigte, nach 18 Generationen sich als inagglutinabel erwies; umgekehrt zeigte ein auf sauren Nährböden gezüchteter Coli-Stamm gesteigerte Agglutinabilität. Nach demselben Autor scheint auch der Gehalt des Mediums an Nährstoffen diese Funktion beeinflussen zu können. Nach Nicolle und Trénel setzt das Züchten von Typhusstämmen bei 42° C die Agglutinabilität stark herab; ein von diesen Autoren aus einem geimpften Meerschweinchen gezüchteter ursprünglich inagglutinabler Stamm behielt bei 25—35° C gezüchtet, in einer Reihe von Generationen diese Eigenschaft, während er bei 10—20° C fortgezüchtet normale Agglutinabilität erlangte. Wie daraus zu ersehen ist, können viele Faktoren die Agglutinabilität der Bakterien beeinflussen und darin findet wohl das abnorme Verhalten der aus unserer Umgebung gezüchteten Stämme zum Teil seine Erklärung. Andererseits gelangen ja meistens ins Wasser Keime, die dem menschlichen Organismus entstammen, so daß sie in manchen Fällen ihre biologische Abnormität schon mitbringen können. Was die aus dem infizierten Organismus gezüchteten Typhusstämmen betrifft, so ist die Ursache ihrer geringeren Agglutinabilität wohl in den biologischen Bedingungen zu suchen, denen sie im Organismus ausgesetzt sind. In einer sehr interessanten Arbeit haben Ransom und Kitashima nachgewiesen, daß man durch Züchten von Cholera vibrios in einer Bouillon mit Zusatz von agglutinierendem Immenserum einen wenig agglutinablen Stamm erlangen kann; nach 20 solchen Passagen wurde er nur bei $\frac{1}{500}$ von einem Serum agglutiniert, das ihn ursprünglich noch bei $\frac{1}{1000}$ agglutiniert hatte. Nach Tarchetti zeigte ein durch eine Reihe von Generationen auf einem agglutininhaltigen Nährboden gezüchteter Typhusstamm vermehrte Agglutinabilität. Sacquépée erzielte durch Züchten in Kollodiumsäckchen im Peritoneum typhusimmunisierter weißer Ratten nach 5 Generationen einen stark hypagglutinablen Typhusstamm; ähnliche, wenn auch minder prägnante Resultate hatte er bei Züchtung in vitro auf agglutininhaltigem Nährboden zu verzeichnen. Dieselbe Erscheinung konnte P. Th. Müller, wenn auch nicht konstant, bei Züchtung von Typhusstämmen auf einer Bouillon mit Zusatz von Typhusimmenserum beobachten; ein solcher Stamm wurde nach 10 Generationen nur bei $\frac{1}{500}$ von einem Immenserum agglutiniert, das den unbeeinflussten Stamm bei $\frac{1}{40000}$ agglutinierte. Aus diesen Beobachtungen folgt, daß die Typhusbacillen bei längerem Kontakt mit Agglutininen gegenüber ihrer Wirkung unempfindlich werden. Es wird uns nicht befremden, daß nicht alle aus dem Organismus gezüchteten Stämme diese Eigenschaft zeigen, wir müssen bedenken, daß nicht in jedem Typhusfall Agglutinine in genügender

Menge entstehen, sowie daß zur Erlangung dieser Unempfindlichkeit öfter auch eine längere Zeit erforderlich sein dürfte. Der Mechanismus dieser Erscheinung wird wohl am besten auf eine Immunisierung der Bakterien gegenüber den Agglutininen zurückzuführen sein; die Bakterien, die überhaupt eine hohe biochemische Plastizität und eine bedeutende Anpassungsfähigkeit aufweisen, können leicht eine solche Immunität erlangen. Schwieriger wird es wohl fallen, anzugeben, auf welcher biochemischen Veränderung in ihrer Zusammensetzung das Zustandekommen dieser Immunität beruht; vor allem wäre hier wohl an eine Vermehrung der agglutinierbaren Substanz, i. e. der Agglutininrezeptoren der Bakterien zu denken. Ransom und Kitashima haben festgestellt, daß die „immunisierten“ Bakterien nicht weniger Agglutinine absorbieren, als normale; es ist zu bedauern, daß diese Autoren ihre Experimente nach dieser Richtung hin nicht vervollständigt haben. Pfeiffer und Friedberger fanden, daß durch oftmalige Tierpassagen auf einer hohen Virulenz erhaltene Cholerasträmme, die 50—100mal geringere Agglutinabilität aufweisen als avirulente, seit langer Zeit im Laboratorium fortgezüchtet, eine bedeutend größere Menge Agglutinin binden, als die avirulenten. Dementgegen berichtet Müller auf Grund seiner Versuche, daß „immunisierte“ Typhusbacillen weniger Agglutinin absorbieren als normale, sowie daß sie an das Kulturmilieu keine freien Rezeptoren abgeben, was man voraussetzen müßte, wenn die Ehrlichsche Theorie auf diesen Immunisierungsprozeß Anwendung finden sollte. Aus allen angeführten Untersuchungen geht hervor, daß die Agglutinabilität der Bakterien bedeutenden Variationen unterworfen ist, wie dies übrigens von anderen biochemischen Merkmalen der Bakterien genugsam bekannt ist, und zwar speziell unter dem Einfluß der biologischen Daseinsbedingungen des betreffenden Stammes. Meine eigenen Beobachtungen bestätigen diese Ergebnisse betreffs der Typhusbacillen und erweitern sie, indem sie zeigen, daß auch ein aus dem infizierten Organismus gezüchteter *Pyocyanus*-Stamm sich als inagglutinabel erweist.

Was nun die Empfindlichkeit gegenüber bakteriziden Serumwirkungen anbelangt, hat die Variabilität dieser Eigenschaft schon seit geraumer Zeit verschiedene Forscher beschäftigt. Leclef untersuchte vergleichsweise die bakterizide Wirkung normalen Kaninchenserums gegenüber 2 Stämmen von Kaninchenseptikämiebakterien verschiedener Virulenz; es ergab sich, daß der stark virulente Stamm gegenüber dieser Wirkung ganz immun ist, während der in seiner Virulenz abgeschwächte, in prägnanter Weise dieser Wirkung erlag. Gleichzeitig konnte Van de Velde in einer gründlichen Arbeit über den Mechanismus der Virulenz des *Staphylococcus pyogenes* feststellen, daß die virulenten Stämme sich von den avirulenten weder durch die Menge der gebildeten Toxine noch durch größere Lebensfähigkeit noch durch üppigeres Wachstum auf künstlichen Nährböden unterscheiden, daß dagegen ihr Verhalten gegenüber aktivem Kaninchenserum ganz different ist. Während ein Stamm, der durch zahlreiche Passagen durch Kaninchen seine Virulenz für diese Tierart 800mal vergrößert hatte, sich in aktivem Serum oder Pleuraexsudat üppig vermehrte, zeigte der wenig virulente Stamm sehr starke bakterizide Empfindlichkeit. Daraus zieht Van de Velde den Schluß, daß das Wesen der Virulenz im Grade der Widerstandsfähigkeit des betreffenden Bakterienstammes gegenüber der Wirkung der bakteriziden Wirkung der Säfte eines gegebenen Organismus beruht. Im Jahre 1895 zeigten Pfeiffer und Kolle, daß man um so mehr von

einem spezifischen Typhusserum bedarf, um eine gewisse Menge Typhuskultur im Meerschweinchenperitoneum abzutöten resp. das Versuchstier zu retten, je virulenter der betreffende Typhusstamm ist, d. h. daß virulentere Stämme zugleich auch resistenter sind gegenüber bakteriziden Serumwirkungen. Dasselbe Verhalten konnte gleichzeitig Bordet bezüglich verschiedener Cholerasträmme feststellen und nach ihm Nadoleczny in seinen Untersuchungen über Cholera- und Typhussträmme verschiedener Virulenz. Während die soeben erwähnten Untersuchungen alle künstlich zu hoher Virulenz heraufgetriebene oder auf einer solchen erhaltene Stämme betreffen, zeigen meine eigenen Ergebnisse, daß frisch aus dem infizierten Organismus gezüchtete Stämme eine erhöhte Resistenz gegenüber der bakteriziden Wirkung des betreffenden Serums aufweisen. Der Zusammenhang zwischen dieser Tatsache und den oben berichteten ist unleugbar; wissen wir ja, daß frisch aus dem Organismus gezüchtete Stämme gewöhnlich virulenter sind, als die außerhalb des Organismus gefundenen oder auf künstlichen Nährböden fortgezüchteten. Außerdem finden wir in der Literatur Beobachtungen, nebenher erwähnt, die die höhere Resistenz solcher Stämme bestätigen. So berichtet Hafkine, daß ein frisch aus einem Typhuskranken herausgezüchteter Typhusstamm sich gegenüber der bakteriziden Wirkung vom Humor aqueus des Kaninchens vollkommen resistenz erweist, während der Laboratoriumstamm prompt abgetötet wird. Kionka, der das Hafkinesche Experiment wiederholte, untersuchte die bakterizide Wirkung von menschlichen Seris resp. Exsudaten auf einen frisch aus einer Typhusmilz isolierten Typhusstamm sowie auf einen seit langer Zeit auf künstlichen Nährböden fortgezüchteten. In diesem Experiment „ist kein deutlicher Unterschied in der bakteriziden Wirkung derselben Flüssigkeit auf beide untersuchten Stämme zu bemerken“. In Übereinstimmung mit Tromsdorff muß ich jedoch bemerken, daß in den von Kionka angeführten Tabellen ein solcher Unterschied sich ganz deutlich bemerkbar macht; vor allem in den Versuchen No. 10, 12, 13; der aus dem Organismus gezüchtete Stamm zeigt zwar auch eine bakterizide Beeinflussung, jedoch in bedeutend geringerem Grade als der Laboratoriumstamm, wie aus zitierten Versuchen zu ersehen ist. In seinen Untersuchungen über aus dem Blute von Typhuskranken gezüchtete Stämme erwähnt Courmont, daß das Serum eines Kranken (Beob. XXV) durch 10 Tage die Entwicklung des Laboratoriumstammes hemmt, während der aus seinem Blute gezüchtete Stamm darin ein rasch einsetzendes Wachstum zeigte.

Wenn wir nun fragen, welchen Grund diese Resistenz der aus dem Organismus kommenden Stämme hat, so finden wir die Antwort darauf in den zahlreichen Untersuchungen, die sich mit der Anpassung der Bakterien an die bakteriziden Kräfte des Organismus befassen. Als erster hat dieses Problem Hafkine im Jahre 1890 in der oben erwähnten Arbeit behandelt; er sah, daß Typhusbakterien, die normalerweise sehr stark der bakteriziden Wirkung vom Humor aqueus unterliegen, sich an diese Wirkung anpassen, wenn man sie auf Nährböden mit successive steigendem Zusatz dieser Flüssigkeit züchtet. Nach 11 Generationen, die auf diese Weise behandelt wurden, konnten sich die Bakterien in unverdünntem Humor üppiger entwickeln, als in gewöhnlicher Bouillon. Im Jahre 1895 hat Bordet die Fragestellung erweitert, indem er experimentell zu erfahren suchte, ob Cholera-vibrionen sich an die Wirkung spezifischen Choleraimmunserums anpassen können; er impfte also die Bakterien in das Serum, die spärlichen überlebenden

Individuen gaben darin eine Kultur, von der nun wieder auf ein frisches Serumröhrchen überimpft wurde, und so fort. Nach 20 solchen Generationen zeigten die Bakterien immer noch die Erscheinungen der Bakteriolyse; da jedoch die Zahl der Passagen zu gering war und außerdem quantitative Verhältnisse nicht berücksichtigt wurden, kann man aus diesen Versuchen kaum bindende Schlüsse ziehen. Szekely stellte weiter fest, daß Bakterien, die durch einmalige Serumpassage an die bakterizide Wirkung eines Serums gewöhnt sind, von ihr weiterhin nicht beeinflußt werden; die dazu erforderliche Zeit der Angewöhnung ist für verschiedene Bakterienarten verschieden. Wir werden angesichts dieser Ergebnisse kaum allzugroßes Gewicht legen können auf die Versuche von Denys und Kaisin, welche sahen, daß in Hundeserum vorgezüchtete *Coli*-Bacillen von diesem Serum auch weiterhin bakterizid beeinflußt werden. In Widerspruch zur angeführten Arbeit von Bordet berichten Ransom und Kitashima, daß ein durch 20 Generationen auf Bouillon mit Zusatz von Immunsorum gezüchteter Cholera Stamm unter dem Einfluß dieses Serums im Meerschweinchenperitoneum fast gar keine Bakteriolyse zeigt, während die Ausgangskultur in ganz typischer Weise aufgelöst wird. Bezüglich der normalen Bakteriolyse zeigte Sawtchenko und sodann Danysz die Möglichkeit der Anpassung von Milzbrandbacillen an die bakterizide Wirkung des Ratten-serums, Tromsdorff die Anpassung von Cholera- und Typhusbacillen an normales Kaninchenserum. Auf Grund dieser Tatsachen wird es wohl am rationellsten sein, die Resistenz der aus dem Organismus gezüchteten Stämme als Ausdruck der Anpassung der Bakterien an die bakteriziden Kräfte des Organismus aufzufassen, wozu ihnen im infizierten Organismus genügend Gelegenheit geboten ist. Es bleibt nun noch, um die Kette der auseinandergesetzten Tatsachen zu schließen, eine Reihe von Arbeiten zu besprechen, die zeigen, daß durch diese Anpassung an die bakteriziden Kräfte eines bestimmten Organismus die Bakterien ihre Virulenz für diesen Organismus steigern. Wir sahen, daß virulente Stämme gegenüber bakteriziden Serumwirkungen resistent sind, die soeben erwähnten Untersuchungen beweisen, daß Bakterien, die durch längere Zeit der Wirkung bakterizider Sera ausgesetzt sind, mit der Zeit dagegen unempfindlich werden — daraus folgt nun logisch der Schluß, daß solche Bakterien wahrscheinlich auch eine höhere Virulenz erlangen dürften. Zahlreiche Untersuchungen, die die Einwirkung von Immunsorum auf Bakterien zum Gegenstand hatten, berühren indirekterweise auch diese Frage; Metchnikoff hat als erster gefunden, daß Hog-Cholera Bakterien in Kaninchenimmunsorum gezüchtet, keine Einbuße an Virulenz erleiden, wie v. Charrin und Roger für den *Pyocyaneus* behauptet haben. Derselbe Forscher fand, daß der von V. Metchnikoff in der vorderen Augenkammer immunisierter Meerschweinchen gezüchtete eine Steigerung seiner Virulenz erfährt.

Aehnlich verhielten sich in Bordets Experimenten dieselben Viren in der *Subcutis* immunisierter Tiere. Diese Ergebnisse wurden in der Folge von Sanarelli und Issaëff bestätigt. Ebenso berichtet Mosny entgegen der Behauptung von Roger, daß Kulturen von Pneumokokken im Serum immunisierter Tiere virulenter sind als entsprechende Kulturen in normalem Serum, wengleich sie weniger Bakterien enthalten, als jene. In einer ausführlichen und recht interessanten Arbeit hat Walker in letzter Zeit nachgewiesen, daß ein in Immunsorum gezüchteter Typhus Stamm seine Virulenz steigert; diese Beobach-

tung ist um so interessanter, als wir es dabei mit einer nicht ganz spezifischen Immunisierung von Bakterien zu tun haben insofern, als die auf einem Immuneserum vom Pferde gezüchteten Bakterien sich für das Meerschweinchen virulenter erweisen. In einer weiteren Arbeit konnte dann Walker durch Züchtung in normalem Kaninchenserum eine Steigerung der Virulenz von Typhusbacillen für Kaninchen und Meerschweinchen erzielen sowie eine Erhöhung der Resistenz gegenüber der bakteriziden Wirkung normalen Kaninchenserums. In letzter Zeit endlich hat Hamburger in Bestätigung der Walkerschen Resultate durch Züchtung in normalen resp. Immuneseris eine Steigerung der Virulenz von Coli- und Choleravibrionen erzielt; über ähnliche Ergebnisse berichtet in den letzten Tagen Shaw. Aus der angeführten Reihe von Untersuchungen ergibt sich zweifellos, daß Bakterien sich an die bakterizide Wirkung der Körperkräfte anpassen können und daß sie dadurch für diesen Organismus eine erhöhte Virulenz erlangen. Angesichts der prinzipiellen Wichtigkeit dieser Tatsache wird auch die Frage höchst interessant, auf welche Weise diese Immunisierung zu stande kommt und ob diese Erscheinung mit den sonstigen Immunitätserscheinungen in eine Reihe zu setzen ist oder ob sie besonderen Gesetzen folgt. Die bisherigen Untersuchungen scheinen das erstere zu beweisen; Danysz, der bei normalen und „immunisierten“ Bakterien ihre Bindungsfähigkeit für die bakteriziden Körper verglich, fand, daß eine zweimal geringere Menge „immunisierter“ Bakterien erforderlich ist, um die bakteriziden Körper einer gewissen Serummenge zu erschöpfen als normaler Bakterien, d. h. daß bei der Immunisierung die Anzahl der Rezeptoren für die bakteriziden Körper an den Bakterien eine Steigerung erfährt. Der morphologische Ausdruck für diese Vermehrung des Rezeptorenapparates ist das Auftreten einer die Bakterien umgebenden Schleimhülle. Ueberdies geben die „immunisierten“ Bakterien diese Rezeptoren an das Kulturmedium ab, so daß ihr Kulturfiltrat eine bedeutend größere Menge bakterizider Stoffe neutralisiert, als dasjenige normaler Bakterien. Andererseits haben Pfeiffer und Friedberger nachgewiesen, daß virulente, d. h. „immunisierte“ Cholerastämme eine bedeutend größere Menge Rezeptoren für bakterizide Körper enthalten, als avirulente Stämme, indem sie im Organismus eine bedeutendere Immunkörperproduktion anregen und in vitro größere Mengen bakterizider Körper binden, als avirulente. Es bleibt noch die Frage übrig, auf welche Weise dieser vermehrte Rezeptorengehalt die Bakterien gegenüber der Wirkung der bakteriziden Körper resistenter macht. Man kann sich in Uebereinstimmung mit Pfeiffer und Friedberger vorstellen, daß schon ein geringer Teil einer gewissen Bakterienmenge im stande ist, eine bestimmte Menge bakterizider Körper zu binden dank ihrem vermehrten Rezeptorengehalt, wodurch der Rest vor der bakteriziden Wirkung geschützt wird, oder aber, was mir rationeller erscheint, daß alle Bakterien in gleichem Maße die bakteriziden Körper binden, daß jedoch angesichts des vermehrten Rezeptorengehaltes die Besetzung eines kleinen Teiles davon nicht genügt, die Bakteriolyse hervorzurufen. In beiden Fällen wäre die Vermehrung des Rezeptorengehaltes eine zweckmäßige Anpassung der Bakterien an den Aufenthalt im tierischen Organismus. Auf Grund der bisher berichteten Arbeiten sowie meiner eigenen Untersuchungen kommen wir also zu folgenden Schlüssen: Die Bakterien können sich an die Wirkung bakterizider Körper sowohl im lebenden Organismus während der Infektion als auch in vitro durch Züchtung

auf Nährböden, die diese Körper enthalten, anpassen; eine Folge dieser Anpassung ist die Immunität gegenüber der Wirkung dieser Körper, bedingt durch die Vermehrung der entsprechenden Rezeptoren. Diese Immunität ermöglicht den Bakterien eine unbehinderte Vermehrung im infizierten Organismus und manifestiert sich als erhöhte Virulenz des betreffenden Stammes für diesen Organismus. Wenn also eine gewisse geringe Menge avirulenter Bakterien, in den Organismus eingeführt, der bakteriziden Wirkung seiner Körpersäfte erliegt und deshalb außer stande ist, eine Infektion hervorzurufen, wird dieselbe Menge virulenter Bakterien der bakteriziden Wirkung standhalten, sich vermehren und eine Infektion herbeiführen können. Die Virulenz der Bakterien ist demzufolge als derjenige Grad ihrer Anpassung an einen bestimmten Organismus zu bezeichnen, der ihnen erfolgreichen Widerstand gegenüber seinen Abwehrmitteln und ungehinderte Vermehrung gewährleistet.

Wir kommen nunmehr zur wichtigsten Frage, nämlich, welche Bedeutung für die Pathogenese und den Mechanismus der Infektion die oben erwiesene Anpassung der Bakterien an die bakteriziden Kräfte des Organismus im Verlaufe der Infektion besitzt. Bei der Erörterung dieser Frage will ich vor allem den menschlichen Abdominaltyphus berücksichtigen, da die oben berichteten Beobachtungen vorzugsweise bei dieser Krankheit angestellt wurden — doch können diese Bemerkungen mit manchen Einschränkungen auch auf andere Infektionen bezogen werden. Unter den an der Infektion teilnehmenden Faktoren hat die Aera der ersten großen Entdeckungen auf dem Gebiete der Aetiologie der Infektionskrankheiten die Rolle der pathogenen Mikroorganismen fast ausschließlich betont. Es schien damals feststehend, daß, wo diese gegeben sind, damit auch die Infektion gegeben ist und daß ihre Eigenschaften im stande sind, alle Besonderheiten der einzelnen Infektionen zu erklären. Aber die mit der Zeit erworbenen Kenntnisse von den Infektionen und der Immunität dagegen, von ihrem verschiedenartigen Verlaufe und der Intensität zeigten, daß ein solches Schema zu eng und zu einseitig ist, und zwingen den anderen Faktor in Rechnung zu ziehen — der zwar der exakten Forschung vorläufig schwer zugänglich ist, wenn ihn auch die geniale Empirie der alten Aerzte schon erraten hat — sie forderten unabweislich die Berücksichtigung des infizierten Organismus und seiner Disposition, der Gattungsdisposition sowohl wie der individuellen, dauernden und zeitlichen. mit seinen angeborenen und erworbenen Schutzmitteln. Gegenwärtig beherrscht unsere Vorstellung von der Infektion die Idee eines Kampfes zwischen dem Organismus und den infizierenden Bakterien. Einerseits haben wir die Mikroorganismen, die auf irgend einem der Wege in genügender Zahl in den Organismus gelangen müssen, andererseits den Organismus, der sich vor dieser Invasion teils mit den ihm normalerweise eigenen Abwehrmitteln verteidigt, teils im Verlaufe der Infektion sich solche neue Mittel schafft. Doch wenn wir auch in letzter Instanz das Wesen jeglicher pathogener Wirkung der Bakterien in der Wirkung spezifischer chemischer Körper, der Bakterientoxine, sehen müssen (logischerweise müssen wir ihre Existenz auch bei jenen Infektionen postulieren, wo sie uns vorderhand noch unbekannt sind), so können wir doch vom Gesichtspunkte der Pathologie die pathogenen Bakterien unmöglich in eine Reihe mit irgendwelchem aus der Pharmakologie unbekanntem Gift stellen, da wir es hier mit lebenden Wesen von wechselnden Eigenschaften zu tun

haben, die in hohem Maße zu weitgehendsten Anpassungen befähigt erscheinen. Wenn also der Organismus zur Bekämpfung der Infektion die bakteriziden Eigenschaften seiner Säfte, die phagocytären Wirkungen seiner Zellen, das Fieber, die Produktion von Immunkörpern u. dergl. ins Treffen schickt, bleiben die Bakterien dabei nicht passiv, sondern passen sich nach Möglichkeit diesen veränderten Bedingungen an. Die Anpassung an die bakteriziden Kräfte des infizierten Organismus repräsentiert sicherlich nur einen gewissen Teil dieser Wechselwirkung, weitere Untersuchungen werden ohne Zweifel auch andere Anpassungsmöglichkeiten in den oben angedeuteten Richtungen nachweisen. Wir können folglich fortan nicht mehr in der Infektionsgleichung nur zwei konstante Größen berücksichtigen — wenn auch nur für einen ganz speziellen Fall — die infizierten Mikroben und den infizierten Organismus, sondern müssen uns immer die variable Größe beider Faktoren immer vor Augen halten, die ganze Reihe möglicher wechselseitiger Anpassungen, deren Resultat erst der klinische Verlauf mit seinem günstigen oder ungünstigen Ergebnisse ist. Diese neue, meiner Ansicht nach sehr wichtige Seite des Infektionsproblems wurde erst in neuester Zeit berücksichtigt: Von Hueppe und Welch auf Grund theoretischer Erwägungen, von Radziewsky im Zusammenhange mit seiner sehr interessanten Infektionstheorie; meine eigenen Beobachtungen geben diesen Anschauungen eine praktische Basis und beweisen die Notwendigkeit der Berücksichtigung dieser Verhältnisse bei jeder Infektionstheorie. Indem wir nun zu den speziellen Punkten, betreffend den Infektionsprozeß, übergehen, begegnen wir vor allem der Frage, wieso überhaupt die Infektion eines Organismus zu stande kommen kann, der gegenüber den betreffenden Mikroben über bakterizide Kräfte verfügt. Aus zahlreichen Untersuchungen wissen wir, daß die Existenz von bakteriziden Körpern im Blute einer gewissen Tierart noch keineswegs eine Immunität dieser Species gegenüber gewissen Infektionserregern bedingt; speziell für den uns interessierenden Fall des Abdominaltyphus ist uns bekannt, daß menschliches Serum auf Typhusbacillen stark bakterizid wirkt, wie soll man sich nun demgegenüber die Möglichkeit einer Infektion beim Menschen erklären? Die Infektion kommt bekannterweise auf dem Wege des Verdauungskanals zu stande; die in den Lymphapparat des Verdauungstrakts eingedrungenen Bakterien finden hier die bakteriziden Körper natürlich nicht in solcher Konzentration vor, wie im Blute. Die empfänglicheren Individuen werden dabei wohl zu Grunde gehen, der Rest wird Gelegenheit finden, sich langsam an diese Wirkung anzupassen und, nachdem sie im Organismus festen Fuß gefaßt haben, ihre pathogenen Wirkungen zu entfalten. In noch anderen Fällen konnten die infizierenden Bakterien — und diese Eventualität wird oft genug eintreten — bereits vorher einen menschlichen Organismus passiert und sich an ihn angepaßt haben, so daß sie nunmehr widerstandslos sich im neuen Wirte vermehren können. Auf diese Weise ist es also die Anpassung der Bakterien — entweder eine gegenwärtig vor sich gehende oder eine schon vorher in einer Reihe von Infektionen erworbene — die Bakterien zum Haften und zur Fortexistenz im infizierten Organismus befähigt — eine Anschauung, die um so mehr gerechtfertigt erscheint, als wir doch auch nur auf diese Weise auf Grund der Evolutionstheorie die Entstehung von pathogenen Abarten der Bakterien aus Saprophyten uns vorstellen können. Doch auch für den weiteren Verlauf und die Besonderheiten des Typhusprozesses ist die

Anpassungsfähigkeit der Bakterien von großer Bedeutung. Wir wissen, daß die in den Follikelapparat des Darmes eingedrungenen Typhusbacillen von hier stetig vom Anfange der Krankheit an ins kreisende Blut gelangen (Schottmüller, Castellani, Courmont), daß ferner auf diesem Wege im Organismus zahlreiche Bakterienmetastasen entstehen: In der Roseola, im Knochenmark, in der Milz und den Nieren. Wir wissen andererseits — auch speziell betreffs des Abdominaltyphus (Stern) — daß auch im Verlaufe von tödlichen Infektionen das Blut seine bakteriziden Eigenschaften bewahrt resp. die aufgebrauchten regeneriert; wie sind nun beide Tatsachen zu vereinen? Es scheint keinem Zweifel zu unterliegen, daß bei diesem Durchgange durch das kreisende Blut ein Teil der Bakterien abgetötet wird — möglicherweise sind auch die Intoxikationserscheinungen beim Typhus zum Teil auf die dadurch aus dem Bakterienkörper freiwerdenden Gifte zurückzuführen — nichtsdestoweniger kann ein Teil der Bakterien dank seiner Immunität gegenüber bakteriziden Wirkungen sich beim Leben erhalten und an den metastatischen Herden lokale Veränderungen hervorrufen. Die Bakterien, die wir aus dem Blute oder aus diesen Metastasen züchten, sind eben jene, welche der Einwirkung der Körpersäfte standgehalten haben, ihre Immunität, die wir in vitro feststellen können, ist ein Ergebnis der Selektion, die im infizierten Organismus vor sich geht. Es ist möglich, daß in Fällen von sogenannter Typhuseptikämie, d. h. schwerer Allgemeininfektion mit sehr geringen anatomischen Läsionen am Darne oder sogar ohne solche die infizierenden, recht virulenten Bakterien auf dem Wege des Kreislaufes in verschiedene Organe gelangen können, ohne an der Infektionspforte lokale Veränderungen zu setzen, ähnlich wie wir es z. B. beim Anthrax unserer Versuchstiere beobachten. Bei dieser Gelegenheit wäre die Frage zu erwägen, ob man, wie Neufeld behauptet, die bakterizide Wirkung des Blutes dafür verantwortlich machen kann, daß die Typhusbacillen, obzwar sie konstant ins Blut gelangen, sich für gewöhnlich darin nicht vermehren; die Anpassungsfähigkeit der Bakterien muß selbstverständlich die Bedeutung dieses Faktors stark einschränken. Auch ist es möglich, daß die Ursache dieser Erscheinung in anderen entwicklungshemmenden Faktoren des Blutes zu suchen ist; sehen wir ja bei der Castellani-Courmontschen Methode, daß die Bakterien trotz der Verdünnung des Blutes von $1/100$ — $1/200$ nur sehr langsam sich vermehren, wofür vielleicht die von Heim hervorgehobene bakterizide Wirkung der Erythrocyten zum Teil verantwortlich zu machen ist. Andererseits ergibt sich aus den Beobachtungen von Schottmüller, daß in letal verlaufenden Fällen sich sogar sub finem die Bakterien im Blute vermehren, was entweder auf ein Sinken der bakteriziden Kraft des Serums oder aber eine erhöhte Anpassung der Bakterien zurückgeführt werden kann. Endlich wäre noch auf Grund der neuerworbenen Kenntnisse die Rolle der bakteriziden Körper bei der natürlichen Heilung des Typhus ins Auge zu fassen. Pfeiffer und Kolle haben gefunden, daß im Blute von Typhusrekonvaleszenten in den ersten Wochen nach der Entfieberung spezifische Immunkörper enthalten sind, die dem Blute normaler Menschen abgehen. Bordet und Gengou konnten mittels einer speziellen Methode ihre Anwesenheit im Blute von Typhusrekonvaleszenten nachweisen. Widal und Le Sourd fanden sie mittels derselben Methode zuweilen schon im Verlaufe der ersten Krankheitswoche, konstant in der zweiten, wobei ihre Menge stetig zunahm bis zum Anfange der Rekonvaleszenz, um

dann nach kürzerer oder längerer Zeit zu sinken. Dementgegen konnte Gieorgiewsky, der ebenfalls die Bordet-Gengousche Methode anwandte, während des Fiebers nie die Anwesenheit der Immunkörper feststellen; nach seinen Angaben erscheinen sie erst in den ersten Tagen der Rekonvaleszenz (unter 21 untersuchten Fällen bei 3 erst am 6. Tage) und zwar zuerst in kleiner Menge, die langsam steigt. Schon diese Umstände lassen die ursächliche Rolle dieser spezifischen Immunkörper für die spontane Heilung des Typhus zweifelhaft erscheinen; dieser Zweifel ist um so mehr berechtigt, als mit dem Erscheinen dieser Körper und selbst mit dem definitiven Fieberabfall die Typhusbacillen im infizierten Organismus durchaus nicht zu Grunde gehen müssen. Zwar sind sie im Blute im Stadium der Apyrexie nach Schottmüller und Courmont nicht mehr nachzuweisen, dafür aber sind sie noch eine geraume Zeit hindurch im Stuhl und Urin zu finden. Obendrein wissen wir aus zahlreichen Beobachtungen, daß die Typhusbacillen sich jahrelang im Organismus latent erhalten können, um dann irgend einen posttyphösen Prozeß anzuregen. Das beweist meines Erachtens, daß die spontane Heilung des Typhus nicht auf der Abtötung der Infektionserreger beruht, wenigstens nicht ausschließlich; ich stimme in diesem Punkte mit A. Wassermann überein, daß die Heilung des Typhus und die dabei erlangte Immunität zum größten Teil auf einer Immunisierung gegenüber den Typhusgiften beruhen muß. Andererseits wird das Erhaltenbleiben der Infektionserreger in einem über stark wirksame spezifische bakterizide Kräfte verfügenden Organismus erst dann verständlich, wenn man die Anpassungsfähigkeit der Bakterien und die darauf basierte Immunität gegenüber diesen Kräften berücksichtigt. Hier sei es mir erlaubt, einige Worte betreffs der ätiologischen Typhustherapie anzuschließen. Es wird natürlich immer das Ideal einer solchen Therapie bleiben, ein zugleich antitoxisches und bakterizides Immunserum anzuwenden. Wenn wir jedoch vorderhand ein bakterizides Immunserum therapeutisch verwenden wollen, scheint es mir angezeigt, den Organismus mit dem Immunkörper auf einmal zu überschwemmen, um den Bakterien die Möglichkeit einer Anpassung an diese Körper zu nehmen. Die von den Bakterien im Organismus erlangte Immunität ist immer nur eine relative; eine starke Konzentration der bakteriziden Körper wird wohl im stande sein, auch diese immunisierten Bakterien abzutöten und den Organismus vom Feinde zu befreien. Indem ich mich vorderhand auf diese kurze Andeutung beschränke, behalte ich mir vor, auf diese Fragen in nächster Zeit ausführlicher zurückzukommen.

Endlich wären noch einige Bemerkungen über die Bedeutung der hier erörterten Befunde für die diagnostische Anwendbarkeit des Pfeifferschen Versuches anzuschließen. Schon Bordet hat seinerzeit darauf aufmerksam gemacht, daß angesichts der wechselnden Resistenz, die Cholerakulturen verschiedener Virulenz im bakteriziden Versuche zeigen, es wohl denkbar erscheint, daß ein besonders virulenter Stamm über die Grenze der Wirksamkeit der angewandten Serumdosierung in seiner Resistenz hinausgeht und somit beim Pfeifferschen Versuche ein negatives Resultat gibt. Nun sahen wir oben, daß gerade frisch aus dem Organismus gezüchtete Typhusstämme, also solche, die eventuell durch den Pfeifferschen Versuch zu agnostizieren wären, sich der bakteriziden Serumwirkung gegenüber resistent erweisen. Nimmt man also, wie Pfeiffer und Kollé vorschreiben, ein gewisses Minimum an Virulenz der Kultur als Vorbedingung, so ist man zwar nach unten

davor gesichert, eine nicht spezifische Reaktion für eine spezifische zu halten, nicht aber nach oben hin, indem eine besonders virulente Kultur, z. B. eine, die in letzter Zeit eine Reihe von Menschenpassagen durchgemacht und sich den bakteriziden Wirkungen besonders gut angepaßt hat, bei einer gegebenen Serummenge sich resistent erweisen kann. Es ist also möglich, daß es ebenso, wie es relativ inagglutinable Typhusstämmen gibt, die dennoch echt sind, daß es ebenso schwer bakterizid zu beeinflussende Stämme geben könnte, die trotz des negativen Ausfalles der Pfeifferschen Reaktion echte Typhusstämmen wären — ein Punkt, der in Zukunft besondere Berücksichtigung verdient.

Zum Schlusse will ich nicht verfehlen, meinem hochverehrten Chef, Herrn Prof. O. Bujwid, auch an dieser Stelle für seine jederzeit mir erwiesene lebenswürdige Unterstützung meinen innigsten Dank auszusprechen.

Krakau, 1. Juni 1903.

Literatur.

- Achard et Bensaude, Sur l'agglutination des divers échantillons du bac. d'Eberth. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1896. 21 nov. p. 940.)
- Achard-Loeper-Grénet, Séro-réaction dans l'infection pyocyaneuse chez l'homme. (Compt. rend. de la soc. de biol. T. LIV. 1902. 15 nov. p. 1274.)
- Bancel, L., De la non-agglutinabilité primitive ou de la moindre agglutinabilité de quelques bacilles d'Eberth provenant de l'organisme. (Journ. de phys. et de path. gén. T. IV. 1902. p. 519.)
- Beljaeff, Ueber einige Eigenschaften agglutinierender sowie auch anderweitiger Serumarten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. 1903. No. 4, 5.)
- Blum, S., Ein Fall von Pyocyaneus-Septikämie mit komplizierender Pyocyaneus-Endocarditis im Kindesalter. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXV. 1899. No. 4. p. 113—116.)
- Bordet, J., Adaptation des virus aux organismes vaccinés. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. VI. 1892. p. 328—333.)
- , Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés. (Ibid. T. IX. 1895. p. 462—506.)
- Bordet, J. et Gengou, O., Sur l'existence des sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. p. 303.)
- Centanni, E., Sulle stomosine. Comm. IV. La vaccinazione in vitro. (Riforma med. 1902. No. 15—16, 34—36.)
- Courmont, J. et Lesieur, Ch., Sur le bacille d'Eberth dans le sang des typhiques. 2. mém. (Journ. de phys. et de path. gén. T. V. 1903. p. 331—340.)
- Danzysz, J., Immunisation de la bactéricidie charbonneuse contre l'action du sérum du rat. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XIV. 1900. p. 641—655.)
- Décobert, Le géodiagnostic des selles dans la fièvre typhoïde. (Compt. rend. de la soc. de biol. T. LIV. 1902. 2 déc. p. 487.)
- Denys et Kaisin, A., Le pouvoir bactéricide du sang. (La cellule. T. IX. 1893. p. 337.)
- v. Drigalski und Conradi, H., Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIX. 1902. p. 283—301.)
- Escherich, Th., Pyocyaneus-Infektionen bei Säuglingen. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXV. 1899. No. 4. p. 117—120.)
- Finkelstein, Bacillus pyocyaneus und hämorrhagische Diathese. (Charité-Annalen. 1897. p. 346.)
- Fischer, A., Die Empfindlichkeit der Bakterienzelle und das bakterizide Serum. (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XXXV. 1900. p. 1.)
- Flexner, S., Thrombi composed of agglutinated red blood corpuscles. (Univ. of Pennsylvania. Bull. XV. 1902. p. 324—326. — Ref. Bull. de l'Inst. Pasteur. T. I. 1903. No. 3. p. 75—76.)
- Foerster, O., Quantitative Untersuchungen über die agglutinierende und bakterizide Wirkung des Blutserums von Typhuskranken und Rekonvaleszenten. (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XXIV. 1897. p. 508—509.)
- Fraenkel, E., Weitere Erfahrungen über den Wert der Widalschen Probe. (Dtsch. med. Wochenschr. 1897. No. 10. p. 244—247.)

- Géorgiewski, K. N., Du moment de l'apparition de la substance sensibilisatrice dans le sang au cours de la fièvre typhoïde. (Ann. de l'acad. de méd. mil. de St. Pétersb. 1902. 24 avril. p. 713. — Ref. Journ. de physiol. et de pathol. gén. T. IV. 1902. p. 796.)
- Hafkine, W. M., Recherches sur l'adaptation au milieu chez les infusoires et les bactéries. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. IV. 1890. p. 363—379.)
- Hamburger, F., Ueber spezifische Viruienzsteigerung in vitro. (Wien. klin. Wochenschr. 1903. No. 4. p. 97—98.)
- Heim, L., Blut, Kärperzellen und Bakterien. (Münch. med. Wochenschr. 1901. No. 18. p. 700.)
- Horrocks, W. H., A comparative study of varieties of *B. coli* isolated from "Typhoid" and normal dejecta. (Journ. of Hyg. Vol. I. 1901. No. 2. p. 202—213.)
- Horton-Smith, On the typhoid Bacillus and typhoid fever. (Goulstonian Lect. Lancet. 1900. Vol. I. p. 821, 910, 1050, 1079.)
- Houston, A. C., Notes on four microorganisms isolated from the mud of the river Thames, which resemble *B. typhosus*. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXIV. p. 518—525.)
- Hueppe, Handbuch der Hygiene. Berlin 1899. p. 31.
- Issaeff, B., Contribution à l'étude de l'immunité acquise contre le pneumocoque. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. VII. 1893. p. 260—285.)
- Johnston-Mc. Taggard, On the difference between etc. (Montreal med. Journ. Vol. XXV. 1897. p. 709.)
- Kionka, H., Versuche über die bakterientötende Wirkung des Blutes. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XII. 1892. No. 10. p. 321—329.)
- Kister, J., Typhusähnlicher Bacillus aus typhusverdächtigem Brunnenwasser. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXII. 1897. No. 18, 19. p. 497.)
- Klein, A., Beiträge zur Kenntnis der Agglutination roter Blutkörperchen. (Wien. klin. Wochenschr. 1902. No. 16.)
- Kolle, W., Zur Serodiagnostik des Typhus abdominalis. (Dtsch. med. Wochenschr. 1897. No. 9.)
- Kossel, H., Zur Frage der Pathogenität des *Bac. pyocyaneus* für den Menschen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XVI. 1894. p. 368.)
- Krannhals, H., Ueber *Pyocyaneus*-Infektionen. (Dtsch. Zeitschr. f. Chir. Bd. XXXVII. 1893. p. 181.)
- Lanz und Lüscher, F., Eine Beobachtung von *Pyocyaneus*-Strumitis. (Korrespzbl. f. Schweizer Aerzte. 1898. No. 5. p. 137.)
- Leclef, J., Rapport entre le pouvoir pathogène des microbes leur résistance au sérum. (La cellule. T. X. 1894. p. 379—399.)
- Manicatide, M., Beiträge zur Frage der *Pyocyaneus*-Infektionen im Kindesalter. (Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. XLV. 1897. p. 68.)
- Metschnikoff, E., Etudes sur l'immunité. VI. mém. Sur la destruction extracellulaire des bactéries dans l'organisme. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. IX. 1895. p. 433—461.)
- Mills, A., De la méthode de sérodiagnostic de la fièvre typhoïde. (Compt. rend. du XII. intern. congr. de méd. Moscou 1898. T. III. p. 167—175.)
- Mosny, Arch. de méd. expér. 1892. No. 2.)
- Müller, P. Th., Ueber die Immunisierung des Typhusbacillus gegen spezifische Agglutinine. (Münch. med. Wochenschr. 1903. No. 2. p. 56—61.)
- Nadoleczny, M., Ueber das Verhalten virulenter und avirulenter Kulturen derselben Bakterien-species gegenüber aktivem Blute. (Arch. f. Hyg. Bd. XXXVII. 1900. p. 277—290.)
- Neufeld, F., Typhus: In Kolle-Wassermanns Handbuch. Liefg. VI/VII. p. 270.)
- Neumann, Arch. f. Kinderheilk. Bd. XII.
- Nicholson, H. R., Report of a case of melaena neonatorum due apparently to an infection by the bac. pyocyaneus. (Amer. Journ. of the med. sc. 1900. Oct. p. 417—429.)
- Nicolle, Ch. et Spillmann, Sur quelques cas de fièvre typhoïde d'origine hydrique certaine. (Compt. rend. de la soc. de biol. Sér. X. T. VI. 1899. p. 154.)
- Nicolle, Ch. et Trénel, M., Recherches sur le phénomène de l'agglutination. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XVI. 1902. No. 8. p. 562—586.)
- Pfeiffer, R. und Friedberger, E., Ueber das Wesen der Bakterienvirulenz nach Untersuchungen an Cholera-vibrionen. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 25. p. 581—585.)
- Pfeiffer, R. und Kolle, W., Ueber die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbacillen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XXI. 1893. p. 203—246.)
- Radziewski, A., Untersuchungen zur Theorie der bakteriellen Infektion. (Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. XXXVII. 1901. p. 1—51.)

- Ransom und Kitashima, Untersuchungen über die Agglutinationsfähigkeit der Cholera vibrien durch Choleraserum. (Dtsch. med. Wochenschr. 1897. No. 19. p. 295—296.)
- Rehns, J., Compt. rend. de la soc. de biol. 1901. 21 déc.
- Rémy, L., Contribution à l'étude de la fièvre typhoïde et de son bacille. 3. mém. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. p. 145—160.)
- Remlinger, P., Contribution à l'étude du pleurotyphus et des pleurésies à bacilles d'Eberth. (Revue de méd. T. XX. 1900. p. 998—1028.)
- Remlinger, P. et Schneider, Contribution à l'étude du bacille typhique. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XI. 1897. No. 1. p. 64.)
- Rodet, J., Sur l'agglutination du B. coli et du B. d'Eberth. I mém. Sur les races de B. coli au point de vue de leur aptitude agglutinative. Variabilité de cette propriété. (Journ. de physiol. et de path. gén. T. I. 1899. p. 806—816.)
- , II mém. Bacilles typhiques cadaveriques à caractères spéciaux. Variabilité de l'aptitude agglutinative. Types de transition entre le Bac. d'Eberth et le B. coli. (Ibid. T. II. 1900. p. 154—165.)
- Sacquépée, E., Variabilité de l'aptitude agglutinative du Bac. d'Eberth. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. No. 4. p. 249.)
- Sanarelli, Moyens de défense de l'organisme contre les microbes après vaccination et dans la guérison. (Ann. de l'Inst. Pasteur. T. VII. 1893. p. 225—259.)
- Schimmelbusch, O., Ueber grünen Eiter und die pathogene Bedeutung des Bac. pyocyaneus. (Volkm. Samml. klin. Vortr. Ser. III. Heft 2. No. 62. p. 303.)
- Schottmüller, H., Zur Pathogenese des Typhus abdominalis. (Münch. med. Wochenschr. 1902. p. 1562.)
- Shaw, E. A., On exaltation of bacterial virulence by passage in vitro. (Brit. med. Journ. 1903. May 9.)
- Smith, Th., Adaptation of pathogenic bacteria to different species of animals. (Philad. med. Journ. 1900. May 5.)
- Smith, J. L. and Tenant, J., A study of the epidemic fever in Belfast 1898. (Brit. med. Journ. Vol. I. 1899. p. 193—197.)
- Le Sourd, Recherches expérimentales et cliniques sur la présence d'une substance sensibilisatrice spécifique dans le sérum des typhiques. Thèse de Paris 1902. (Ref. Bull. de l'Inst. Pasteur. T. I. 1903. No. 4. p. 150.)
- Székelly, A., Untersuchungen über die sog. bakterizide Wirkung des Blutes. (Magyar Orvosi Archivum. 1896. p. 1. — Ref. Baumg. Jahrb. Bd. XII. 1895. p. 742—744.)
- Tarchetti, C., Sul valore della serodiagnosi nell' infezione tifoide. (Clin. med. ital. Vol. XXVIII. 1899. No. 1. p. 16—32.)
- Trommsdorff, R., Ueber Gewöhnung von Bakterien an Alexine. (Arch. f. Hyg. Bd. XXXIX. 1901. p. 30—46.)
- Vaillard, Recherche du bac. typhique dans les eaux. Disc. X intern. congr. d'hyg. et démogr. à Paris 1900. I Sect. (Presse méd. 1900. No. 73. p. 152.)
- Van de Velde, H., Etude sur le mécanisme de la virulence de la staphylocoque pyogène. (La cellule. T. X. 1894. p. 401—461. — Bull. de l'acad. roy. de Belg. 1897. 27 mars.)
- Walker, E. W., Immunisation against immune serum. (Journ. of Path. a. Bact. 1902. March. p. 34—51.)
- , On exaltation of bacterial virulence by passage onto the animal body. (Brit. med. Journ. 1902. Oct. 18.)
- Wassermann, A., Wesen der Infektion in Kolle-Wassermanns Handb. Liefg. II. p. 271—272.)
- Mc. Weeney, The agglutinability of different races of typhoid bacillus. (Lancet. 1899. Vol. I. p. 380.)
- Welch, H. W., L'immunité (confér. Huxley). (Revue scientif. T. XIX. 1903. No. 9. p. 97—113.)
- Widal, F. et Le Sourd, Recherches expérimentales et cliniques sur la sensibilisatrice dans le sérum des typhiques. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1901. 5 oct. p. 841.)
- Williams, E. P. and Cameron, K., Upon the general infection by the Bac. pyocyaneus in children. (Journ. of Path. a. Bact. Vol. III. 1894. p. 347.)

Nachdruck verboten.

Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus.

[From the Jenner Institute of Preventive Medicine, London.]

By Dr. Allan Macfadyen and Sydney Rowland.

With 2 Figures.

(Schluß.)

IV. Apparatus and methods.

It will be advisable in the first instance to give a full description of the methods that have been specially devised and employed for obtaining directly the intracellular juices of the typhoid bacillus and other organisms. The general principle consists in freezing the micro-organisms to an extreme degree of brittleness by means of liquid air, and disintegrating the cells *per se* in a mechanically operated mill.

In the case of the expressed juices obtained by the sand and Kieselguhr method, about 100 agar culture bottles were required to furnish an adequate growth of the organisms for grinding purposes. In the present method, ten such agar cultures are sufficient for a single grind of the micro-organism in question. This in itself is a great saving in time and material.

The virulent typhoid organisms are grown on the surface of ten agar bottles at blood heat for 24 to 30 hours. The growth is then washed off with salt solution and the resultant emulsion of bacilli is spun in a high speed centrifuge. The process is repeated several times with freshly added salt solution, in order to cleanse the organisms from any extraneous matter. The spun out bacteria are next reduced to the consistency of a pasty mass by a rapid drying on the surface of a Chamberland filter through which air is being sucked.

The average yield of washed bacteria, when freed as far as possible from adherent water, was about 0.15 g per culture plate. This represented quantitatively 1.5 ccm

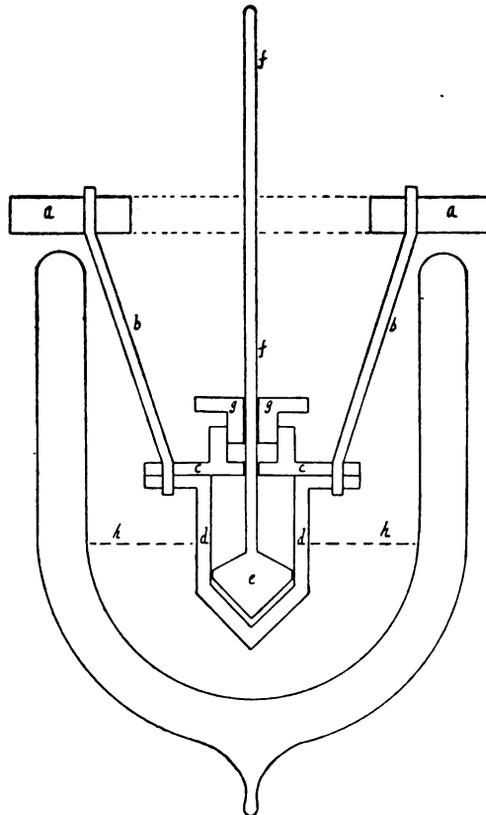


Fig. 1. Diagrammatic vertical section of liquid air grinding apparatus.

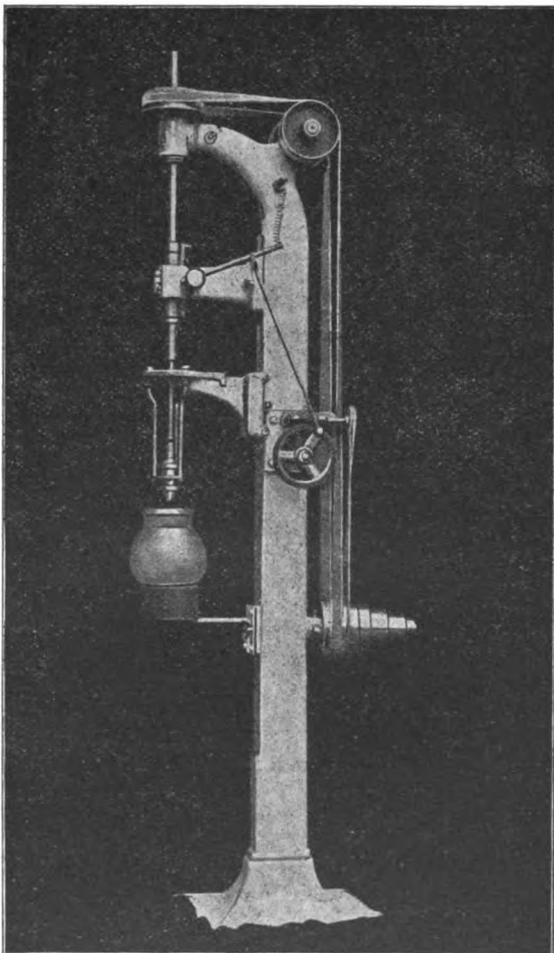


Fig. 2. Photographic reproduction of liquid air grinding apparatus.

of the 10 per cent salt solution of the cell juice prepared after the disintegration of the cells.

The pasty mass of washed organisms is removed from the Chamberland filter and is introduced into the apparatus shown in diagrammatic section in fig. 1. This apparatus is constructed as follows: The horizontal plate *A* (also seen in the photographic reproduction fig. 2) supports by the rods *BB* the plate *CC*. This plate, circular in plan forms the cover of the conical receptacle *DD* on which is free to revolve the doubly coned plunger *E*. The vessel *D* can be removed from the covering plate *C*, to which it is attached by bolts, for the purpose of introducing the material to be disintegrated, as in this instance the typhoid bacilli. The plate *CC* is furnished with a gland *GG*, closely packed with ignited

asbestos, through which works the rod *F*, which rigidly supports the cone *E*. The joint between *CC* and *DD* is made by means of an annular paper washer. A continuous rotary motion is imparted to *F* by means of the mechanism shown in fig. 2. At the same time a reciprocating motion is imparted by the worm and wheel gear seen at the side of the main supporting columns of the apparatus. When in operation, the apparatus is immersed in liquid air up to the level *HH*.

The operation of the machine is as follows. On the descent of *F*, *E* is kept rotating with considerable pressure against *D*, and the surface of *E* being finely knurled, any material between *E* and *D* is reduced to powder, in which condition it finds its way into the upper cone of *E*. On the ascent of *F* (still revolving) this coarse powder falls to the bottom of *D*, and is again forcibly rubbed between the lower cone of *E* and the bottom of *D*, on the next descent of *F*. This sequence of operations is

continued until no entire micro-organisms are found on microscopical examination, a result which can be accomplished in from 1 $\frac{1}{2}$ to 2 hours, when dealing with 0.5 to 1 g of pasty organisms. It must be remembered that as the above sequence of operations will take place at about — 190° C., the contents of *D* are in the condition of a dry powder.

As a result of this process, there is obtained a pasty mass (when thawed), consisting of the entire substance of the organisms used. Moreover, this substance, at the moment of thawing, is chemically identical with the living protoplasm of the cell, the whole disintegration having occurred under conditions which preclude the possibility of any chemical change taking place.

This pasty mass is mixed with salt solution (0.75 p. c.), rubbed up in an agate mortar, and the opaque suspension thus obtained is centrifuged until free from suspended matter, and an opalescent solution of the intracellular constituents of the organism results.

The centrifugalisation of such minutely divided material is occasionally a matter of difficulty, more especially if, by chance any unground organisms are found in the suspension. In those cases, in which a sterile juice is required the centrifugalisation must be very vigorous, and for this purpose it has been found that the best results are given by a very simple form of centrifuge, consisting of a horizontally mounted steel disc (36 inches in diameter) on the periphery of which are mounted strong glass tubes in steel cases hung on trunnions, the disc making from 3,000 revolutions per minute. The glass tubes to prevent fracture under the great strain are floated in mercury, contained in the covering steel tubes. With such a disc, sterile juices have been obtained.

The centrifuged celljuice was as a rule equivalent to a 10 per cent solution of the intracellular constituents obtained. It represented the intracellular constituents of the typhoid organisms soluble in physiological salt solution, after a complete disintegration of the cells had been accomplished.

It is this material which was used in the experiments we are about to describe and it consisted of a bacterial celljuice practically identical with that contained within the living cell.

These juices likewise had the merit of possessing a constant constitution, and thus were capable of being standardised as regards their physiological action.

V. Demonstration of intracellular toxin.

The first experiments were carried out with the view of testing whether the typhoid celljuices obtained by cold grinding methods possessed any toxic properties. It was found that if such a disintegrated mass be freed from whole bacilli (if present) and from other suspended insoluble particles by centrifugalisation, an opalescent fluid results which on inoculation into animals in small doses, invariably proves toxic or fatal. It was therefore concluded that the typhoid bacillus contains within itself an intracellular toxin. The toxin thus obtained and employed for experiment is a ten per cent solution in normal saline of such intracellular constituents of the typhoid bacillus as are soluble in such a medium.

The standard adopted in estimating the toxicity of the typhoid celljuice was the amount found to prove fatal on intraperitoneal injection into the guinea pig. The intracellular fluid under these circumstances invariably proved toxic in a short period of time. The toxicity of the juices

varied *pari passu* with the virulence of the living bacilli for the guinea pig. The greater the virulence of the organism employed, the greater was the toxicity of the intracellular constituents obtained from it, and vice versa. For example, the toxicity of the plasma obtained from an organism of which 0.1 ccm of a broth culture killed in a few hours was greater than in the case of an organism of which larger quantities of a broth culture failed to produce death in the same period of time.

In the case of a broth culture of the typhoid organism of such a degree of virulence that $\frac{1}{10}$ of a cube on intraperitoneal injection, produced death in five to ten hours, the toxicity of the celljuice obtained from the same organism would be on an average as follows. On intraperitoneal injection, 1 ccm of such a toxin killed in 3 hours; 0.5 ccm in 3 to 4 hours; 0.2 and 0.1 ccm in 3 to 5 hours; 0.05 ccm in about 12 hours and 0.02 ccm in about 40 hours.

We have likewise obtained a juice of which 0.02 ccm has killed in six hours.

The best result so far obtained as regards acute toxicity, was in the case of a 10 per cent toxin of which 0.003 ccm killed within 24 hours.

No organisms were found in the blood or peritoneal cavity on postmortem examination. The effects were therefore produced by "devitalised" constituents of the typhoid bacillus. The peritoneal cavity contained a considerable amount of exudation; haemorrhages were present in the stomach; the small intestine was acutely congested and the suprarenal capsules were injected.

Similar results to the above were obtained in a very large number of repetition experiments and justified the conclusion that the typhoid bacillus contains an intracellular soluble toxin of considerable power.

The toxin on subcutaneous injection into the guinea pig produced a toxin oedema at the seat of inoculation, and death has occurred after the injection of 0.5 ccm and 0.2 ccm of the toxin in about seven days.

One of the effects of a sublethal dose of the toxic juice was the early and constant appearance in the blood of marked agglutinating properties, and sometimes this occurred a few hours after e. g., an intravenous injection. The constant presence of this reaction served to demonstrate the specificity of the celljuices with which we were dealing.

The heat relationships of the toxins derived from the typhoid bacillus and other organisms are being investigated, and the results will be published in due course.

VI. Immunising properties of the typhoid celljuices.

It remained to test the typhoid celljuices for immunising and other properties. The preliminary experiments in this direction were made upon the rabbit and the monkey. The monkey was selected as an animal most likely to furnish data of possible application to man. For this purpose the typhoid celljuice was administered subcutaneously to the monkey. The injections did not produce any general symptoms beyond a transient rise in temperature, whilst the material was quickly absorbed after each injection without any traceable effect.

In this manner doses of 0.5 to 1 ccm of the material were injected at intervals. An immediate result was the agglutination of the typhoid bacillus by the serum of the treated monkeys, whereas no such effect was produced by the serum of monkeys which had not been treated.

This furnished useful evidence that the animals were under the in-

fluence of celljuices derived from the typhoid organism. The injections were repeated at intervals of 3—4 days, and after a lapse of 4—6 weeks the animals were bled.

The serum obtained was then tested for immunising properties. The test objects were 1) a virulent culture of the typhoid bacillus and 2) the intra-cellular toxic juice of the same organism. A varying amount of the virulent bacilli and of their toxic celljuice was mixed with a varying quantity of the serum. The respective mixtures were then injected into the peritoneal cavity of the guinea pig.

The broth cultures of the typhoid organism used in the experiments were per se lethal in doses of 0.1 ccm in 5—10 hours. The typhoid celljuices were fatal in doses of 0.2 and 0.1 ccm in 3—5 hours and in doses of 0.05 ccm in about 12 hours. The serum was thus tested for 1) specific antibacterial and 2) specific antitoxic properties.

The experiments showed that the serum of the monkey, after injection of the typhoid celljuices, possessed antibacterial and antitoxic properties, inasmuch as the serum protected the experimental animals against the bacilli, and also against an intracellular toxin obtained from them.

A simultaneous injection of 1) serum with the bacilli, and 2) serum with the toxic celljuice produced no lethal or toxic effects. The control animals on the other hand invariably succumbed.

It was further investigated whether the serum possessed preventive and curative properties.

The serum from treated monkeys was injected into guinea pigs, one injection being made in each instance, and the same animals received at an interval of 12—24 hours lethal doses of the typhoid bacillus and of its toxic intracellular juice respectively. The treated animals survived the test, whilst the control animals succumbed. It was therefore concluded that the serum had protective properties.

A third series of guinea pigs received lethal doses of the typhoid bacillus and of its toxic celljuice respectively. The serum was then injected at various intervals into individual animals. It was found that the lives of the animals could be saved by one injection of the serum, from a fatal infection or intoxication, even when half of the lethal period had elapsed in each instance. The serum therefore, possessed curative properties. From the experiments made upon the monkey it would appear 1) That by the injection of the intracellular juices of the typhoid organism into the monkey, it is possible to obtain a serum with both antibacterial and antitoxic properties; 2) That such a serum possesses curative and preventive properties as regards the typhoid bacillus and an intracellular toxin present in the same organism. It is believed that this has furnished for the first time proof that in the case of one species of pathogenic organism, the intracellular juices of the organism when injected into a suitable animal, give rise to the production of a serum which is both bactericidal to the organism itself and antitoxic as regards a toxin contained in its substance. How far such properties of the celljuice are shared by other pathogenic organisms is being made the subject of further inquiry.

In the case of the rabbits treated with the typhoid celljuice, antibacterial and antitoxic properties were likewise found to be developed in their blood. The experiments which have been made with the goat are confirmatory of the above results, its serum likewise possessed antibacterial

and antitoxic properties as regards the typhoid bacillus and the soluble toxin derived from it. At the present moment the experiments are being conducted on the horse.

The *in vitro* experiments that have been made with the various serums obtained have confirmed the results obtained in the experimental animals.

It was important to determine, whether in addition to being antitoxic, the serum obtained from the experimental animals was likely under further treatment to possess an enhanced antitoxic value, and whether as in the case of diphtheria, any "overproduction" of antitoxin could be demonstrated. We have found that the serum of an animal immunised by repeated injections of celljuice in doses of 0.2 ccm, can completely neutralise the toxic effect of one hundred times the amount of a typhoid celljuice that is capable of producing death on intraperitoneal injection into the guinea pig in six hours.

We conclude, therefore, that as the antitoxic value can be raised by repeated injections, there is every reason to hope that it can be still further raised by longer treatment.

To those familiar with Ehrlich's elaborate standardising methods with regard to the diphtheria toxin, the absence of similar data from this paper will no doubt be noted. It will, however, be equally obvious that a method of standardising and testing which has after much experiment by many observers, reached a high empirical standard of efficiency cannot be applied to a toxin of an entirely different nature.

We are engaged in the consideration of the best method of standardisation to be adopted with special reference to the typhoid toxin and intracellular toxins in general, and the lengthy experiments involved have not yet been completed. We must therefore, content ourselves with giving the protocol of a typical experiment.

Experiments with serum from monkey B.

Injections intraperitoneal.

0.2 ccm toxin killed in 4½ hours.

0.25 " broth cult. killed in 10 hours.

A. Injection of serum followed by injection of typhoid culture and toxin.

At 5 p. m. injection of serum made.

Guinea Pig 1	Guinea Pig 2	Guinea Pig 3	Guinea Pig 4
0.5 ccm	0.25 ccm	1 ccm	1 ccm

the following day at noon

0.25 typ. cult.	0.25 typ. cult.	0.2 toxin	0.1 toxin
-----------------	-----------------	-----------	-----------

B. Simultaneous injection of serum and broth culture of typhoid bacillus.

Guinea Pig 5	Guinea Pig 6	Guinea Pig 7	Guinea Pig 8
0.5 serum	0.25 serum	0.1 serum	0.05 serum
0.25 broth cult.	0.25 broth cult.	0.25 broth cult.	0.25 broth cult.

C. Simultaneous injection of serum and toxin.

Guinea Pig 9	Guinea Pig 10	Guinea Pig 11	Guinea Pig 12
1.0 ccm serum	0.5 ccm serum	0.2 ccm serum	0.1 ccm serum
0.2 " toxin	0.2 " toxin	0.2 " toxin	0.2 " toxin

D. Injection of typhoid bacillus followed by injection of serum.

Guinea Pig 13	Guinea Pig 14	Guinea Pig 15
At 12.50 0.25 ccm typ. broth cult.	0.25 ccm typ. broth cult.	0.25 ccm typ. broth cult.
At 1.30	At 2.30	At 3.30
0.25 ccm serum	0.4 ccm serum	0.5 ccm serum

Guinea Pig 16	Guinea Pig 17
At 12.50 0.25 ccm typ. broth cult.	0.25 ccm typ. broth cult.
At 4.30	At 5.30
0.4 ccm serum	0.5 ccm serum

E. Injection of toxin followed by injection of serum.

Guinea Pig 18	Guinea Pig 19	Guinea Pig 20	Guinea Pig 21	Guinea Pig 22
At 1 p. m.	At 1 p. m.	At 1 p. m.	At 1 p. m.	At 1 p. m.
0.2 ccm toxin	0.2 ccm toxin	0.2 ccm toxin	0.2 ccm toxin	0.2 ccm toxin
At 1.30 p. m.	At 2 p. m.	At 2.30 p. m.	At 3 p. m.	At 3.30 p. m.
0.2 ccm serum	0.5 ccm serum	0.7 ccm serum	1 ccm serum	1 ccm serum

All the animals survived the above test with the exception of No. 2 which died after two days, and No. 21 which survived 4¹/₂ hours.

VII. General conclusions.

Experiments are at present being conducted on the horse.

It remains to be seen in how far the results already obtained are capable of being utilised outside the laboratory in clinical directions.

It appears to us that the results detailed above possess considerable theoretical interest. The experiments have furnished a demonstration of the fact that it is possible to prepare a serum in the case of a given organism which is bactericidal to the organism in question and antitoxic as regards a toxin contained within its substance. Further, the experiments by the demonstration of the presence of a specific intracellular toxin, may, it is possible, serve to explain the most striking feature in the course of typhoid fever — the intoxication.

As regards the practical methods of preparing bacteriolytic serums, an immunisation of the animals by means of disintegrated cells offers many advantages in practice, through the absence of serious local reaction and the rapidity of absorption of the inoculated material.

There appears also, the possibility of obtaining bacterial vaccines of greater purity and capable of more accurate standardisation in the case of Enteric Fever, of Plague and other diseases, the symptoms of which may depend upon the presence of intracellular toxins in their exciting organisms. This matter is one that is engaging our careful attention.

In conclusion we have to express our appreciation of the valuable advice and help afforded by Professor James Dewar. F. R. S. in the course of these and other investigations.

References.

- 1) Macfadyen, Rowland and Morris, On expressed yeast cell plasma. (Proc. Royal Society. Vol. LXVII.)
- 2) Macfadyen, A., On the influence of the prolonged action of the temperature of liquid air on microorganisms. (Ibid. Vol. LXXI.)
- 3) Macfadyen, A. and Rowland, S., An intracellular toxin of the typhoid bacillus. (Ibid. Vol. LXXI.)
- 4) Macfadyen, A., Upon the immunising effects of the intracellular contents of the typhoid bacillus. (Ibid. Vol. LXXI.)
- 5) Wakelin Barratt, J. O., On the disintegration of rabid brain substance. (Ibid. Vol. LXXI.)
- 6) George J. Petrie, On the relation of the leucocytes to the bacteriolytic power of the blood. (Journal of Path. and Bacteriology. 1903.)
- 7) Harden, A. and Macfadyen, Enzymes in Tumours. (Lancet. July 25th. 1903.)

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Biologie des Milzbrandbacillus und sein Nachweis im Kadaver der grossen Haustiere.

Von **J. Bongert**,

städtischem Tierarzt und Leiter des bakteriologischen Laboratoriums auf dem städtischen Schlachthofe zu Berlin.

Mit 3 Tafeln.

(Fortsetzung.)

Im ersten Augenblick wird es allerdings befremdlich erscheinen, daß der tierische Organismus nicht den besseren und zuträglicheren Nährboden für die Entwicklung pathogener Bakterien darstellt, und daß er nicht mindestens dasselbe leistet als der tote Nährboden. Allein man darf nicht übersehen, daß der Tierkörper über natürliche Schutzkräfte verfügt, die von den pathogenen Bakterien zunächst überwunden werden müssen. So z. B. ist durch die Versuche von Fodor (37), Buchner (38), Nuttall (39) u. a. speziell für den Milzbrandbacillus nachgewiesen, daß das frische Blut bezw. das zellenfreie Blutserum (Buchner) verschiedener Tierspecies die Milzbrandbacillen abtötet und vernichtet. Diese natürliche Resistenz kann sich nun bei einzelnen Individuen zu einer vollkommenen Immunität steigern. Eine solche Immunität ist verschiedentlich bei den Immunisierungsversuchen gegen Milzbrand beobachtet worden, indem von den als Kontrolltiere verwandten Schafen und Kaninchen einzelne die Impfung mit Milzbrand überstanden. Eine solche individuelle Immunität kommt auch gar nicht so selten bei Mäusen vor. Ich habe den negativen Ausfall der zu Demonstrationszwecken vorgenommenen Impfung von Mäusen mit virulenter Milzbrandkultur mehrere Male beobachten können. Die Mäuse zeigten sich mehrere Tage krank, überstanden aber die Infektion, während andere mit derselben Kultur geimpfte Tiere prompt innerhalb 24 Stunden starben. Dieses Lebenbleiben einzelner Mäuse läßt sich nur durch die Annahme erklären, daß auch bei diesen hoch empfänglichen Tieren eine individuelle Immunität vorkommen kann.

Zu dieser natürlichen Resistenz der Impftiere kommt aber noch hinzu, daß der Milzbrandbacillus leicht äußeren Schädlichkeiten zugänglich ist, welche eine mehr oder minder tiefeingreifende Schwächung seiner pathogenen Eigenschaften zur Folge haben und seine Fähigkeit zur ungestörten Entwicklung im Tierkörper beeinträchtigen. Die Möglichkeit einer solchen Virulenzabnahme beweisen vor allen Dingen die Pasteur'schen Schutzimpfungen und die hiernach vielfach modifizierten Immunisierungsversuche gegen Milzbrand. Behring (40) zeigte, daß die Milzbrandbacillen durch die Einwirkung desinfizierender Mittel, wie z. B. von Aqua chlori, Jodtrichlorid etc., derartig abgeschwächt werden, daß sie nicht mehr pathogen wirken, wohl aber noch auf Nährböden gedeihen. Weiterhin wissen wir aus den Untersuchungen von Metschnikoff (41), daß die außerhalb des Tierkörpers im Blute schutzgeimpfter Hammel gezüchteten Milzbrandbacillen fast vollkommen ihre Virulenz verlieren, so daß von geimpften Kaninchen nur ein einziges an Milzbrand starb.

Phisalix (42) stellte fest, daß die Milzbrandbacillen durch Passage natürlich immun oder wenig empfänglicher Tiere (Hund) abgeschwächt werden. Diese Tatsachen beweisen die leichte Möglichkeit einer Virulenz-

abnahme der Milzbrandbacillen und berechtigen auch zu der Annahme, daß auch im faulenden Tierkörper durch die Einwirkung der Fäulniskeime oder ihrer Toxine eine Abschwächung der Virulenz der Milzbrandstäbchen stattfindet. Und in der Tat scheint die Annahme einer die Virulenz der Milzbrandbacillen abschwächenden Wirkung der Fäulnistoxine durch die Versuche von Kostjurin und Krainsky (43) bewiesen, welche nach Hinzufügen einer bestimmten Quantität von Fäulnistoxinen zu einer Reinkultur von Milzbrandbacillen den vollständigen Verlust ihrer pathogenen Eigenschaften beobachteten, während im Wachstum und in morphologischer Beziehung eine Abweichung nicht zu konstatieren war. Nach meinen Untersuchungen scheint jedoch diesem Verlust der Virulenz eine Abnahme der Zahl der lebensfähigen Milzbrandbacillen infolge bakteriolytischer Wirkung der Fäulnistoxine zu Grunde zu liegen, da nach einer gewissen Zeit der Einwirkung der Fäulnistoxine (Filtrat von fauligem Blute und fauliger Bouillon) die Milzbrandbacillen sich fast vollkommen aufgelöst zeigten, andererseits aber eine neue Kultur von diesen mit Fäulnistoxinen behandelten Milzbrandbacillen sich wieder vollkommen virulent zeigte.

Zu der natürlichen Resistenz der Impftiere und der schwankenden Virulenz der Milzbrandbacillen gesellt sich nun noch als ein die diagnostische Milzbrandimpfung hauptsächlich ungünstig beeinflussendes Moment die antagonistische Wirkung einer ganzen Reihe von Bakterien auf die Milzbrandbacillen. Die Tatsache, daß die Milzbrandbacillen bei vorausgeschickter oder gleichzeitiger oder selbst nachfolgender Verimpfung von verschiedenen Bakterien im Körper von empfänglichen Tieren nicht zur Entwicklung gelangen, sondern unter der antagonistischen Wirkung der letzteren in ihrer pathogenen Wirkung gelähmt und vernichtet werden, ist schon lange bekannt, jedoch bisher ausschließlich zu Immunisierungsversuchen gegen Milzbrand verwertet worden. C. Fraenkel (18) hat zuerst darauf hingewiesen, daß in diesem hemmenden Einfluß anderer Bakterien die Erklärung für den häufigen negativen Ausfall der diagnostischen Milzbrandimpfung zu suchen sei. Mit Untersuchungen über den Antagonismus der Bakterien auf die Milzbrandinfektion haben sich eine ganze Reihe von Autoren beschäftigt.

Emmerich (44), der zuerst Untersuchungen über diese Frage anstellte, wies für die Erysipelkokken eine solche hemmende Wirkung auf die Milzbrandinfektion nach. Er stellte fest, daß durch gleichzeitige Verimpfung von Erysipelkokken und Milzbrandbacillen bei Kaninchen nicht nur die Milzbrandinfektion, sondern sogar die Ausbildung jedweder Krankheitserscheinungen verhindert werden könne. In einer Versuchsreihe blieben von 9 Kaninchen, welche nach Vorbehandlung mit Erysipelkokken mit virulenten Milzbrandbacillen subkutan geimpft wurden, 7 am Leben, während die gleiche Anzahl Kontrolltiere prompt an Milzbrand starb.

Pawlowsky (45) hat die Versuche Emmerichs bestätigt, zeigte aber dann, daß noch der Pneumoniebacillus von Friedländer und der *Micrococcus prodigosus* im stande sind, die Milzbrandinfektion hemmend zu beeinflussen. Zu denselben Resultaten in Betreff des Antagonismus der Erysipelkokken auf die Milzbrandbacillen gelangte Döhle (46). Mühlmann (47) konstatierte, daß die Milzbrandbacillen in Symbiose mit dem *Diplococcus Fraenkel* die Fähigkeit verlieren. Kaninchen tödlich an Milzbrand zu infizieren. Nach den Untersuchungen von Olitzky erwies sich der *Bac. fluorescens* als ausgesprochener Anta-

gonist den Milzbrandbacillen gegenüber und zwar durch Giftwirkung. Bouchard (49) bewies dasselbe für den *Bac. prodigiosus* und den *Bac. pyocyaneus*. In Betreff des letzteren nimmt er einen hemmenden Einfluß der Stoffwechselprodukte desselben auf den Verlauf der Milzbrandinfektion an. Zu demselben Resultat gelangten auf Grund von Versuchen mit sterilisierten *Pyocyaneus*-Kulturen Woodhead und Wood (50) und Roger (51). Buchner (52) erzielte durch gleichzeitige oder nachfolgende subkutane Verimpfung von lebenden oder abgetöteten Kulturen der Friedländerschen Pneumoniebacillen eine Hemmung der Milzbrandinfektion bei 21 Kaninchen, und zwar dauernde Heilung in 11 Fällen, Hinausschiebung des Todes in 10 Fällen, während 8 Kontrolltiere in der normalen Zeit an Milzbrand starben. Als Ursache der Hemmungswirkung auf die Milzbrandinfektion sieht Buchner die eitrige Entzündung an der Impfstelle an, welche sowohl durch lebende wie sterilisierte Kulturen hervorgerufen wird.

v. Dungern (53) führt die eklatante antagonistische Wirkung der Friedländerschen Bacillen auf die Milzbrandinfektion auf eine gesteigerte Tätigkeit der Leukocyten zurück, welche unter dem Einfluß der Stoffwechselprodukte des Friedländerschen Bacillus sich in größerer Zahl ansammeln und die Milzbrandbacillen aufnehmen und zerstören.

Weiterhin konnten Baumgarten und Czaplewsky (54) an Meerschweinchen, Beco (55) und G. Frank (56) an Mäusen feststellen, daß die gleichzeitige Verimpfung einer Mischkultur von Staphylokokken und Milzbrandbacillen die Milzbrandinfektion unterdrückt. Der Regel nach sterben die Mäuse an Staphylokokkenseptikämie und nur ausnahmsweise an protrahiertem Milzbrand.

Sodann sind verschiedene Untersuchungen über die antagonistische und heilende Wirkung der Stoffwechselprodukte des *Bac. pyocyaneus* auf die Milzbrandinfektion angestellt worden. Emmerich und seine Mitarbeiter (l. c.) stellten fest, daß die Milzbrandbacillen im Tierkörper und in Bouillonkulturen durch den *Bac. pyocyanens* bzw. seine Stoffwechselprodukte in kurzer Zeit abgetötet und durch Quellung und eine Art Verdauung vollständig aufgelöst werden. Es handelt sich hierbei nach Emmerich um ein proteolytisches Enzym, welches er Pyocyanase nennt. Infolge der Einwirkung der Pyocyanase tritt nicht eine wahre Virulenzabnahme der Milzbrandbacillen ein, wie Charrin (l. c.) angenommen hat, sondern es handelt sich um eine progressive Abtötung und Auflösung einer von Tag zu Tag zunehmenden Zahl von Milzbrandbacillen. Hierdurch allein wird der Tod der Impftiere hinausgeschoben oder letztere bleiben am Leben.

Nach Dietrich (57), welcher die tatsächlichen Angaben von Emmerich bestätigt, soll es sich nicht um einen Verdauungsprozeß durch ein Enzym, sondern um ein Absterben der Milzbrandbacillen in einem für sie ungeeigneten Medium handeln. Alsdann erfolge eine Auflösung der Bacillen, wobei osmotische Verhältnisse eine große Rolle spielen (Plasmolyse und Plasmoptyse).

Nach den obigen Ausführungen können eine ganze Reihe von Bakterien, die überall vorkommen und auch sekundär in Milzbrandkadavern sich ansiedeln können, einen hemmenden Einfluß auf die Milzbrandinfektion ausüben. Wir müssen demnach mit der Möglichkeit eines solchen hemmenden Einflusses durch sekundäre Bakterien, wodurch der Tierversuch von vornherein ungünstig beeinflusst wird, auch in der Praxis rechnen. Es kann daher nicht befremdlich erscheinen, daß die dia-

gnostische Milzbrandimpfung so oft im Stiche läßt und nicht das leistet, was man bisher von ihr vorausgesetzt hat. Eine entscheidende Bedeutung für die Milzbranddiagnose, besonders in den zweifelhaften Fällen, ist der Impfung nicht länger beizumessen, wie man bisher getan hat.

3. Der Nachweis der Milzbrandbacillen durch Plattenkultur.

Der Nachweis der Milzbrandbacillen durch das Plattenverfahren stützt sich auf die Annahme, daß denselben ein ganz charakteristisches Wachstum eigentümlich ist, wodurch ein leichtes Erkennen an dem Aussehen der Kolonie auch in einem Bakteriengemisch ermöglicht ist. Als typisch für den Milzbrand wird allgemein sein Wachstum auf der Gelatine- oder Agarplatte angesehen (Koch, Flügge). Einen Unterschied im Wachstum auf diesen beiden Nährböden habe ich nicht konstatieren können. Die Verwendung des Agars hat aber vor derjenigen der Gelatine den Vorzug, daß er selbst bei hoher Außentemperatur fest bleibt, was den weiteren Vorteil in sich schließt, daß die Agarplatten viel eher ein Wachstum erkennen lassen können als die Gelatineplatten, da erstere ein Bebrüten bei dem Temperaturoptimum von 37° ermöglichen, während letztere bei einer Temperatur unter 22° gehalten werden müssen, da sonst die Gelatine sich verflüssigt und der Nachweis von Milzbrandkolonien in Frage gestellt wird. Der Milzbrandbacillus bildet bekanntlich auf der Oberfläche der Agar- und Gelatineplatte schön gelockte, medusenhauptähnliche Kolonien (Phot. 4), welche makroskopisch ein weißes, atlasglänzendes Aussehen besitzen. Allerdings zeigen die Kolonien gewisser Stäbchen, welche in die Gruppe der Heu oder Wurzelbacillen gehören, ebenfalls einen gelockten Rand (Phot. 6). Doch ist die Lockenbildung weniger zierlich, regelmäßig und deutlich ausgeprägt. Auch erreichen jene Kolonien meistens eine beträchtliche Größe, da sie das Bestreben zeigen, sich oberflächlich auszubreiten. Eine sichere Unterscheidung wird in zweifelhaften Fällen durch die Vergleichung des Zentrums der Kolonie oder der in der Tiefe gewachsenen Kolonien herbeigeführt. In der Tiefe der Agarschicht wächst der Milzbrandbacillus ebenso charakteristisch wie auf der Oberfläche. Die tiefen Milzbrandkolonien gleichen makroskopisch kleinsten, mit zarten Ausläufern versehenen Flaumfederchen. Bei 50-facher Vergrößerung erscheinen sie als grauschwarze unregelmäßige Gebilde, welche ein eigentliches Zentrum nicht erkennen lassen und aus wenigen starren oder leicht gebogenen Ausläufern gebildet werden. Die tiefe Milzbrandkolonie setzt sich zusammen aus verschieden großen, grobkörnigen, ovalen Stücken, welche durch rankenartige Fäden und knotige Aestchen miteinander verbunden sind. Das Ganze besitzt ein moosartiges Aussehen und kann mit dem Kelche einer Moosrose verglichen werden (Phot. 5, 8). Die tiefen Kolonien der für eine Verwechslung in Frage kommenden „Heu- oder Wurzelbacillen“ besitzen viele fadenförmige, mehr geradlinig verlaufende strahlige Ausläufer und Verästelungen, so daß der Vergleich mit der Haarkrone einer Distel zutreffend erscheint (Phot. 7, 9).

An der unteren Fläche zwischen Glas und Agarschicht wächst der Milzbrandbacillus zu einem feinen, dünn gelockten Belage aus. Tritt von den in der Tiefe gewachsenen Kolonien einer von den in verschiedener Ebene liegenden Ausläufern an die Oberfläche, so bildet er sofort Haarlocken, die alsdann zu einer kometenschweifartigen Kolonie auswachsen.

Die Größe der oberflächlichen und auch der tief gelegenen Kolonien

hängt von dem mehr oder weniger dichten Wachstum ab. Die oberflächlichen Milzbrandkolonien zeigen jedoch selbst bei isoliertem Aufgehen der Kolonien bedeutend weniger Tendenz zum Oberflächenwachstum und erreichen deshalb nicht die Größe wie die in ähnlich aussehenden Kolonien wachsenden und saprophytisch vorkommenden Stäbchenarten.

Das beschriebene charakteristische Aussehen der in der Tiefe gewachsenen Kolonien, sowie die Bildung von feinen, deutlich hervortretenden Locken in Gestalt eines Kometenschweifes, sobald einer der wenigen Ausläufer die Oberfläche der Agarschicht erreicht hat, gewähren sichere Anhaltspunkte für die Erkennung einer Milzbrandkolonie auch unter unzähligen anderen Kolonien (Phot. 8). Bemerken möchte ich noch, daß die deutliche Lockenbildung der Milzbrandkolonien nur in den ersten 2 Tagen vorhanden ist, mit Eintritt der Sporenbildung jedoch allmählich an Deutlichkeit abnimmt und verschwindet.

In sämtlichen Versuchen hat sich nun ergeben, daß das Plattenverfahren gegenüber der Impfung und dem morphologischen Nachweise im gefärbten Deckglasausstriche am sichersten zu einer richtigen Diagnose führt. Dasselbe leistete in jedem einzelnen Falle mehr wie das Ausstrichpräparat, von der Impfung gar nicht zu reden, und selbst noch mehrere Tage später, wenn der Nachweis im gefärbten Ausstriche nicht mehr gelang, gingen noch typische Milzbrandkolonien auf, welche aus dem Bakteriengemisch isoliert auf ihre sonstigen biologischen Eigenschaften geprüft werden konnten. Nur bei einer Untersuchungsprobe (No. 6), welche in einer Flasche mit der Aufschrift „Karbolsäure“ überwiesen wurde, gingen schon vom 2. Tage der Untersuchung an in den angelegten Platten keine Milzbrandkolonien mehr auf, während in den Ausstrichpräparaten noch mehrere Tage lang Milzbrandbacillen nachzuweisen waren. Durch Nachfrage bestätigte sich der Verdacht, daß vor dem Einfüllen des Milzbrandmaterials reine Karbolsäure sich in der Flasche befunden hatte, welche man durch einmaliges Ausspülen zu entfernen versucht hatte. Durch Nachprüfung in der Weise, daß nach Benetzen der Innenwand einer Flasche durch Ausspülen mit 3-proz. Karbolwasser abgestrichene Pulpa einer Milzbrandmilz in dieselbe eingefüllt wurde, konnte in der Tat die intensive abtötende Kraft der stark verdünnten Karbolsäure auf die Milzbrandbacillen festgestellt werden, wie dieses bereits Koch (1d) hervorgehoben hat. Somit fand der anfangs überraschende negative Plattenbefund auf einfache Weise seine Erklärung.

Meine Versuchsergebnisse bestätigen die von C. Fraenkel gemachten Beobachtungen (l. c.) und stehen auch im Einklange mit den seit einer Reihe von Jahren im hygienischen Institute der tierärztlichen Hochschule zu Berlin bei den bakteriologischen Milzbrandfeststellungen über die Zuverlässigkeit des Plattenverfahrens gemachten Erfahrungen.

John e und Klett (l. c.) haben eine Lebensfähigkeit der Milzbrandbacillen so lange angenommen, als dieselbe mit gut differenzierter Kapsel sich präsentieren. Auf Grund meiner Untersuchungen stimme ich im allgemeinen dieser Ansicht zu, soweit das Unversehrtsein als Bedingung für die Lebensfähigkeit sich auf den Bacillenleib bezieht. Denn eine Bacillenkapsel ist nicht stets vorhanden, und dennoch sind, wie aus den Versuchstabellen zu ersehen ist, die Milzbrandbacillen noch lebens- und keimfähig. Ja selbst wenn die Milzbrandbacillen auf-

fallende bakteriolytische Veränderungen zeigten, der Bacillenleib ungefärbte Lücken aufwies, gingen in den Platten noch Milzbrandkolonien auf. Es steht dies im Einklange mit Feststellungen von A. Fischer (l. c.), wonach die Bakteriolyse sich wieder vollständig ausgleichen kann, ohne daß durch dieselbe die Lebensfähigkeit der Bacillen beeinträchtigt worden wäre. Nun sind einzelne Autoren auf Grund von Versuchen, bei welchen der Nachweis der Milzbrandbacillen durch Impfung gelang, das Kulturverfahren aber im Stiche ließ, zu der Ansicht gelangt, daß die Keimfähigkeit des Milzbrandbacillus eher schwindet oder durch die Fäulnisbakterien unterdrückt wird als die Infektionsfähigkeit. Hierauf dürfte auch die bisherige Vorliebe für die Impfung bei der Milzbrandfeststellung gegenüber dem Kulturverfahren zum Teil zurückzuführen sein. Lange (l. c.) begründet seine Meinung, daß „die Impfung das feinere und schärfere Reagens auf Milzbrand“ darstellt, mit dem Hinweis, „daß die Milzbrandbacillen durch die übermäßige Konkurrenz der reichlich entwickelten Fäulniskeime geschwächt und überwunden werden, während andererseits bei der relativen Unschädlichkeit vieler Fäulniskeime für den tierischen Organismus oder auch dadurch, daß letztere den tierischen Organismus schwächen und selbst wenig virulentem und abgeschwächtem Milzbrand gegenüber resistenzunfähig machen, beim Tierversuche die Möglichkeit für das Zustandekommen einer Milzbrandinfektion weit günstiger liegen“. Diese Ansicht Langes ist, wie C. Fraenkel (l. c.) in seiner Arbeit bereits bewiesen und wie aus meinen Versuchen mit Sicherheit hervorgeht, als unrichtig zu bezeichnen. Daß die pathogenen Eigenschaften der Bakterien, ihre Virulenz, außerhalb des Tierkörpers bedeutend früher verschwinden als die Keimfähigkeit, lehrt die täglich zu machende Beobachtung beim künstlichen Fortzuchten pathogener Bakterien. Dieselben können ihrer Virulenz vollständig verlustig geworden sein, aber dennoch besitzen sie für lange Zeit noch ihr Fortpflanzungsvermögen. Vor allen Dingen ist aber in Betracht zu ziehen, daß die antagonistische Wirkung der verschiedenen Bakterien auf virulente Milzbrandbacillen sich nur im Tierkörper und nicht in der Kultur, weder in flüssigen noch auf festen Nährböden, geltend macht. Buchner und v. Dungern (l. c.) u. a. haben bewiesen, daß die antagonistische Wirkung auf die Milzbrandinfektion nicht auf eine bakterizide Wirkung oder auf eine Entwicklungshemmung oder selbst auf eine wirkliche Abschwächung der Milzbrandbacillen zurückzuführen ist, sondern daß die hemmende Wirkung der Bakterien auf die Milzbrandinfektion auf einer antitoxischen Wirkung beruht, welche im Tierkörper durch die Einwirkung der letzteren auf die Gewebszellen bedingt wird.

Wie Emmerich für die Erysipelkokken, Pawlowsky für den *Micrococcus prodigiosus*, v. Dungern für den Friedländer'schen Pneumoniebacillus, Beco u. a. für die Staphylokokken u. s. w., so habe ich in gleicher Weise für *Bact. coli*, *Proteus*, *Bac. butyricus*, *Bac. acidi lact.*, *Bac. phosphorescens*, den *Bacillus* der Kälberruhr und der Schweinepest, für *Staphylococcus albus* und verschiedene Fäulnisstäbchen einen wachstumshemmenden Einfluß auf den Milzbrandbacillus nicht nachweisen können. Auch die Auskeimung von Milzbrandsporen wird durch diese Bakterien nicht verhindert, wohl aber wird die Sporenbildung in mehr oder weniger erheblichem Grade ungünstig beeinflusst. Es muß demnach als bewiesen angesehen werden, daß die Infektiosität der Milzbrandbacillen, nicht

aber ihre Keimfähigkeit, durch andere Bakterien gehemmt und aufgehoben werden kann. Hierzu kommt aber noch, daß eine tödlich endende Milzbrandinfektion auch von der Zahl der Milzbrandbacillen abhängig ist, wie F. Klemperer, Gabritschewsky (58) und Sobernheim (59) nachgewiesen haben. Kaninchen konnten 30—140 virulente Milzbrandbacillen ertragen, ohne zu sterben. Nach meinen Versuchen sind 7—10 Milzbrandbacillen erforderlich, um bei Mäusen eine in 3—5 Tagen tödlich endende Milzbrandinfektion herbeizuführen (s. w. u.). Nach Klemperer sind 4—5 Milzbrandbacillen zu einer tödlichen Infektion bei Mäusen erforderlich. Im faulenden Milzbrandmaterial nimmt aber die Zahl der lebensfähigen Milzbrandbacillen von Tag zu Tag rapide ab, wovon man sich durch Plattenaussaat leicht überzeugen kann. Es ist also stets die Möglichkeit vorhanden, daß zu einem gewissen Zeitpunkt, wo die Untersuchung stattfindet, lebensfähige Milzbrandbacillen in der für eine tödliche Infektion erforderlichen Zahl nicht mehr in dem verimpften Untersuchungsmaterial sich vorfinden, die aber in der Platte noch sehr gut nachzuweisen sind.

Durch die obigen Ausführungen glaube ich bewiesen zu haben, daß das Plattenverfahren gegenüber der Tierimpfung bei der Milzbranddiagnose eine größere Sicherheit gewährt und den Vorzug verdient, und es ist anzunehmen, daß in den Fällen, in denen das Tierexperiment gelang, die Plattenkultur aber angeblich im Stiche ließ, auch auf der Platte sich lebensfähige Keime haben entwickeln müssen, daß aber deren Kolonien übersehen worden sind. Ich möchte die Fehlresultate, welche einzelne Autoren bei dem Plattenverfahren erhalten haben, darauf zurückführen, daß nur die oberflächlich gewachsenen Kolonien auf Haarlockenbildung geprüft wurden, die in der Tiefe gewachsenen Milzbrandkolonien als solche jedoch nicht erkannt worden sind, oder aber daß die Durchmusterung der dicht bewachsenen Platten unterlassen wurde in der Meinung, daß in letzteren ein Erkennen von Milzbrandkolonien unmöglich sei. Jedoch selbst in einer dicht bewachsenen Platte lassen sich an den von mir angegebenen Merkmalen die in der Tiefe aufgegangenen Milzbrandkolonien als solche erkennen. Diese muß man aufsuchen, da in den Platten von faulem Milzbrandmaterial bei dem dichten Wachstum die Lockenbildung auf der Oberfläche fast vollkommen unterdrückt wird. Außerdem kommt es aber auch bei der Untersuchung von faulem Milzbrandmaterial sehr viel auf den Grad der Verdünnung in der zur Platte ausgegossenen Kulturmasse an. Nehmen wir z. B. an, in dem zur ersten Verdünnung in 10 ccm Agar verwandten Milzbrandmaterial (3 Oesen) befänden sich noch 10 entwicklungsfähige Milzbrandbacillen. Von diesen 10 ccm Kulturmasse des Röhrchens No. 1 werden wiederum 3 Oesen auf Röhrchen No. 2 und von letzterem drei Oesen auf Röhrchen No. 3 übertragen, dann ist bei der minimalen Menge, welche zum Anlegen der Platte No. 2 dem Röhrchen No. 1 entnommen wird, die größte Wahrscheinlichkeit vorhanden, daß kein einziger entwicklungsfähiger Milzbrandbacillus auf die Platte No. 2 gelangt und noch weniger auf die Platte No. 2. In der Platte No. 1 sind aber die Milzbrandkolonien überwuchert und unter der übermäßig großen Zahl der aufgegangenen Kolonien von Fäulnisbakterien nicht zu erkennen. Es ist eine einfache Wahrscheinlichkeitsrechnung, die sich aus den angegebenen Zahlen: 10 Milzbrandbacillen auf 10 ccm Kulturmasse und hiervon 3 Oesen = 0,01 ccm, ohne weiteres ergibt, und nach welcher man auf das Aufgehen von Milzbrandkolonien in der

Platte No. 2 kaum rechnen kann. Man kann 100mal je 3 Oesen dem Röhrchen No. 1 entnehmen und zu ebensoviele Platten ausgießen, dann hat man 1mal die Aussicht, daß 1 Milzbrandkolonie aufgeht. Demnach wird man in solchen Fällen, wo weit vorgeschrittene Fäulnisprozesse eine starke Abnahme der lebensfähigen Milzbrandbacillen vermuten lassen, gemäß dieser einfachen Ueberlegung nicht in der üblichen Verdünnung 3—4 Platten anlegen, sondern man verteilt die ganze Kulturmasse der ersten Verdünnung auf eine größere Anzahl von Röhrchen und gießt diese zu ebenso vielen Platten aus. Hierdurch erreicht man, daß die wenigen noch vorhandenen keimfähigen Milzbrandbacillen als erkennbare Kolonien trotz des starken Bakteriengehaltes von Fäulnisstäbchen aufgehen und sich nicht der Feststellung entziehen.

Das Plattenverfahren bietet außer der größeren Zuverlässigkeit noch den Vorteil, daß man die charakteristisch erscheinenden Kolonien isolieren und die weiteren biologischen Verhältnisse, vor allen Dingen die Pathogenität mit den Reinkulturen, prüfen kann. In zweifelhaften Fällen, namentlich bei milzbrandähnlichen Kulturen, kann man in der Regel schon durch ein gefärbtes Ausstrichpräparat oder durch die Untersuchung im hängenden Tropfen auf etwaige Beweglichkeit mit Leichtigkeit eine Unterscheidung von Milzbrandbacillen herbeiführen, da die saprophytischen Stäbchen, welche in der Platte ein ähnliches Wachstum zeigen, wie der Milzbrandbacillus, nach meiner Erfahrung zum Unterschied von letzteren alle beweglich sind. Auch die Bouillonkultur bietet in der Regel sichere differentialdiagnostische Merkmale. Während die Milzbrandbacillen die Bouillon klar lassen und auf dem Boden des Röhrchens in Form eines feinen flockigen Niederschlages wachsen, der aus einem Gewirr von langen Milzbrandfäden besteht, durchwachsen jene Stäbchen die Bouillon gleichmäßig, da sie beweglich sind, und bilden alsdann unter gleichzeitiger Klärung der Bouillon und Sedimentierung eine Kahlhaut, welche sich durch Schütteln nicht zerteilen läßt. Endlich gestattet die Plattenkultur in zweifelhaften Fällen noch die Prüfung der Pathogenität mit der Reinkultur. Ich habe eine größere Anzahl von Stäbchen verschiedenster Provenienz mit milzbrandähnlichem Wachstum auf der Platte isoliert, aber alle zeigten sich nicht pathogen. Nach Verimpfen von großen Dosen (1 ccm Bouillonkultur) starben die Mäuse nur vereinzelt, in der Milz fanden sich jedoch keine milzbrandähnlichen Kapselstäbchen, sondern die verimpften Stäbchen als vereinzelt plumpe Langstäbchen mit abgerundeten Enden. Durch Tierpassage erlangten letztere keine höhere Virulenz, sondern was den ganz vereinzelt Tod der Mäuse nach länger als 48 Stunden zur Folge hatte, war die Masse des verimpften Materials. Man kann also bei zweifelhaftem Plattenbefunde nach den bis jetzt vorliegenden Erfahrungen eine sichere Diagnose herbeiführen.

Nachdem der Beweis der Zuverlässigkeit des Plattenverfahrens erbracht ist, ist noch nachzuweisen, ob der Milzbrandbacillus, auch im abgeschwächten Zustande das oben beschriebene als typisch anzusehende Wachstum zeigt. Es ist die Konstanz des Wachstums auf der Platte zu beweisen. Ich habe nun versucht, nach den verschiedensten Methoden eine größere Anzahl von verschiedenen Milzbrandstämmen abzuschwächen. Es war mir aufgefallen, daß die Pasteurschen Milzbrandvaccins in der Platte ein ganz differentes Wachstum zeigten, welches mit dem der Milzbrandkolonien keine Aehnlichkeit mehr besaß. Die Kolonien sind geschlossen, zeigen nur einen leicht gewellten Rand,

aber keine Haarlockenbildung. (Phot. No. 10.) Die tiefen Kolonien sind unregelmäßig rund, grauschwarz, ohne Ausläufer. Die Bouillonkultur ist getrübt, nach beendigtem Wachstum klärt sie sich unter Bildung eines flockigen Bodensatzes. Die Stäbchen, welche länger und dünner wie die Milzbrandbacillen sind, bilden in der Bouillon keine langen Fäden, sondern nur kurze, 2—3gliedrige Verbände. Mäuse, Kaninchen, Meerschweinchen sterben innerhalb 24—72 Stunden mit dem Bacillenbefunde, wie beim Milzbrande, jedoch sind die Kapselstäbchen länger wie bei ersterem. Mit ziemlich übereinstimmendem Resultat habe ich 4 Vaccinproben, 2 aus Stuttgart und 2 aus Paris, untersucht. Ich versuchte nun 4 verschiedene Milzbrandstämme nach der Pasteurschen Methode in Vaccins überzuführen. Als ich die bei 42—43° C gehaltenen Kulturen nach 14 Tagen durch Plattenaussaat prüfte (Vaccine II), zeigten die aufgegangenen Kolonien das charakteristische Aussehen der Milzbrandkolonien. Mit demselben Resultat untersuchte ich nach 4 und 5 Wochen die bei 42—43° gehaltenen Bouillonkulturen auf das Aussehen der aufgegangenen Kolonien (Vaccin I). Das einzig Auffallende war die starke Abnahme der Zahl der aufgegangenen Kolonien, welche in ihrem Aussehen vollständig mit Milzbrandkolonien übereinstimmten. Von 8 Mäusen, mit 1 und 2 Oesen 5-wöchiger bei 42—43° gehaltenen Bouillonkulturen geimpft, gingen 7 innerhalb 3—7 Tagen an Milzbrand ein, 1 Maus blieb am Leben, während 4 mit den nicht erhitzten Ausgangskulturen geimpfte Kontrollmäuse innerhalb 24 Stunden an Milzbrand starben. Bei den an protrahiertem Milzbrand eingegangenen Mäusen waren durch Ausstrich und Kultur Milzbrandbacillen nicht nachzuweisen. Nach 6 Wochen langer Kultivierung bei 42—43° blieben sämtliche Platten steril. 4 Mäuse, mit je 2 Oesen subkutan geimpft, blieben gesund. Als ich jedoch zu jeder Platte 0,25 ccm von jeder der 4 bei 42—43° gehaltenen Bouillonkulturen verwandte, gingen nur in 1 Platte 3 typische Milzbrandkolonien auf, die anderen 3 Platten blieben auch bei dieser reichlichen Aussaat steril. Ich impfte nun mit den aufgegangenen Milzbrandkolonien 2 Mäuse mit je einer Oese, desgleichen 2 andere Mäuse mit einer Kultur, welche ich aus einer am 6. Tage nach der Impfung mit einer 5 Wochen lang erhitzten Kultur gestorbenen Maus erhalten hatte. Sämtliche 4 Mäuse starben prompt innerhalb 24—36 Stunden. Die gleiche Verzögerung des Todes erzielte ich bei Mäusen, wie bei der Impfung mit der 5 Wochen bei 42—43° kultivierten Milzbrandkulturen, mit der 2. Verdünnung von virulenten Milzbrandkulturen, welche in 0,2 ccm 7—30 Milzbrandbacillen enthielt. Die Bestimmung der Bacillenzahl geschah durch Plattenkultur mit derselben Kulturmenge. Aus dem Versuche geht also hervor, daß durch die permanente Kultivierung bei 42—43° eine allmähliche Abnahme der Zahl der lebensfähigen Milzbrandbacillen herbeigeführt wird, aber keine Abschwächung im wahren Sinne des Wortes. Mit der Kultivierung von 4 anderen Milzbrandstämmen bei 42—43° erzielte ich kein anderes Resultat. Es trat ebenfalls nur eine allmähliche Abnahme der entwickelungsfähigen Milzbrandbacillen ein, bis schließlich nach 5 bis 6 Wochen nur noch sehr wenige Milzbrandbacillen vorhanden waren, so daß erst bei Verimpfung von 0,2 ccm Kultur die Mäuse nach 5 bis 7 Tagen an protrahiertem Milzbrand mit in der Regel negativem Bacillenbefunde starben. Die in den Platten aufgegangenen Kolonien zeigten jedoch das typische Aussehen der Milzbrandkolonien.

R. Koch, Gaffky und Loeffler (1c.) erzielten nach der

Pasteurschen Methode der Kultivierung bei 42—43° C nach 29 Tagen wirklich abgeschwächten Milzbrand, welcher sich auch bei der Weiterzucht für Meerschweinchen und Mäuse selbst bei Verimpfung großer Dosen vollkommen avirulent erwies. Die physiologische Unwirksamkeit vererbte sich von Generation zu Generation. Die Form der Bacillen hatte sich in keiner Weise geändert. Sie bildeten lange Fäden mit scharf abgesetzter Gliederung und in diesen Sporen, wie der virulente Milzbrandbacillus. Es konnte mehrere Male beobachtet werden, als die Abschwächung der Bouillonkulturen sich bemerkbar machte, daß nur vereinzelte Kolonien in den von ersteren abgeimpften Gelatinekulturen aufgingen. Diese Kolonien zeigten zum Unterschiede von virulenten Milzbrandkolonien keine kräftige Fadenentwicklung „die Kolonie blieb im ganzen kleiner, die Fäden waren kurz, stark gewunden, gekräuselt“. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigten die einzelnen Glieder kolbige und wurstförmige Auftreibungen. Die abnorme Entwicklung zeigte sich jedoch nur in der ersten Generation; sobald eine solche Kultur weiter überimpft wurde, stellte sich sogleich das typische Bild des Milzbrandwachstums wieder ein.

Koch und seine Mitarbeiter führen dieses „pathologische Wachsen“ auf den Einfluß der mitverimpften Zersetzungsprodukte zurück, welche sich in der Bouillon durch das Wachsen der Milzbrandbacillen gebildet haben.

Mit der Pasteurschen Methode erzielten Koch, Gaffky und Löffler eine vollkommene Abschwächung der Milzbrandbacillen unter gleichzeitigem Abnehmen der Zahl derselben, Bildung von Involutionsformen und in einzelnen Fällen unter vorübergehender Veränderung des typischen Wachstums der Milzbrandkolonie. Meine Fehlresultate in Betreff einer wirklichen Abschwächung des Milzbrandbacillus möchte ich auf die Verwendung von Rinderbouillon als Nährmaterial zurückführen, während Koch und seine Mitarbeiter gemäß den Anlagen Pasteurs Hühnerbouillon benutzten. Ohne Zweifel hat aber der Nährboden auf die Virulenz der Milzbrandbacillen einen Einfluß und dieses um so mehr, wie aus den Beobachtungen Metschnikoffs (l. c.) zu folgern ist, wenn zur Herstellung des Nährbodens Fleisch von einem milzbrandimmunen Tier, so z. B. vom Huhn, verwandt wird. Später habe ich die Methode der Abschwächung des Milzbrandes nach Pasteur nochmals mit Verwendung von Hühnerbouillon an 2 Milzbrandstämmen versucht und konnte nun in der Tat nach 27 Tagen eine allmähliche Umwandlung der vorher typisch gewachsenen Milzbrandkolonien in vaccinähnliche Kolonien mit gleichzeitiger Abnahme der Virulenz feststellen. Eine Konstanz der vaccinähnlichen Kolonien wurde jedoch erst mit dem 38. Tage der Züchtung erreicht. Vorher nahmen die von der Platte abgeimpften geschlossenen, atypischen Milzbrandkolonien mit vaccinähnlichem Aussehen bei der Fortzucht wieder normales Wachstum mit Lockenbildung an. Der Umwandlungsprozeß in vaccinähnliche Kolonien spielte sich in den Hühnerbouillonkulturen in derselben Weise ab, wie bei den weiter unten erwähnten Methoden der Abschwächung, weshalb ich darauf verweisen möchte. Der Umstand, daß Koch und seine Mitarbeiter kein dauerndes atypisches Wachstum der abgeschwächten Milzbrandkulturen erzielen konnten, dürfte auf die nicht lange genug fortgesetzte Züchtung bei 42—43° zurückzuführen sein. In neuester Zeit hat sich eingehend mit Untersuchungen über die Abschwächung der Milzbrandbacillen nach der Pasteurschen Methode Sobornheim (59)

beschäftigt. S. konstatierte bei seinen abgeschwächten Milzbrandstämmen außer verzögertem Wachstum keine Abweichung von virulenten Milzbrandbacillen, auch nicht in der Form, während die Pasteurschen Vaccins außer Wachstumsverzögerung auch Formabweichungen in sonst typischen Kolonien auf Gelatine zeigten. Letzteres habe ich nicht bestätigen können. Sowohl auf der Gelatine- wie Agarplatte zeigen die Pasteurschen Vaccins atypisches Wachstum, geschlossene Kolonien ohne Haarlockenbildung. S. führt die abweichende Gestalt der Vaccinbacillen nicht auf die Art der Abschwächung, sondern auf Rassenverschiedenheiten der Milzbrandstämme zurück.

Ich versuchte nun mit der Methode von Chamberland und Roux (60) eine Abschwächung von Milzbrandkulturen herbeizuführen und zwar durch Züchten bei 37° C in Bouillon mit Karbolsatz 1:600 bis 1000. Durch Plattenaussaat konnte ich nun in 1 von 4 Milzbrandstämmen feststellen, daß allmählich vom 18. Tage an die Lockenbildung der oberflächlich gewachsenen Kolonien undeutlicher wurde, bis sie schließlich fast vollkommen verschwunden war, und die Kolonien das geschlossene runde Aussehen zeigten, wie die der Pasteurschen Vaccins. Vollkommen zeigte sich diese Umwandlung der Kolonien am 28. Tage der Züchtung. Dasselbe Resultat erzielte ich bei 2 Milzbrandstämmen mit der von Phisalix (65) empfohlenen Methode der Züchtung bei 42° mit gleichzeitigem Ueberimpfen auf ein anderes Bouillonröhrchen an jedem 5. Tage. Mit dem einen Milzbrandstamme erhielt ich nach 4maligem Ueberimpfen, also nach 20 Tagen, asporogenen Milzbrand, und nach weiteren 2 Abimpfungen zeigten die spärlich auf der Platte aufgehenden Kolonien ein geschlossenes, leicht gewelltes Aussehen, wie die Vaccinkolonien. Mit dem anderen Milzbrandstamme gelang die Ueberführung in vaccinähnliche Kolonien nicht. Bedeutend sicherer und schneller gelangte ich zum Ziele, als ich nach den Angaben von Surmont und Arnould (61) die Rouxsche Methode mit der von Phisalix angegebenen verband. Nach 8-tägigem Züchten in karbolisierter Bouillon bei 37° und daran sich anschließendem 2maligem Ueberimpfen an jedem 5. Tage in gewöhnliche Bouillon erhielt ich asporogenen Milzbrand und nach weiteren 2 Ueberimpfungen vaccinähnliche Kolonien bei 2 Milzbrandstämmen. Die Ueberführung in vaccinähnliches Wachstum erfolgt ganz allmählich derart, daß zuerst in den Platten wenige Kolonien mit vaccinähnlichem Typus unter vielen typischen Milzbrandkolonien aufgehen (s. Phot. 11—14). Die Zahl zu Gunsten der ersteren vergrößert sich alsdann immer mehr, bis schließlich fast nur vaccinähnliche Kolonien und spärliche typisch gewachsene Milzbrandkolonien nachzuweisen sind. Gleichzeitig mit der Veränderung der oberflächlichen Kolonien, dem Ausbleiben der Haarlockenbildung, nehmen auch die in der Tiefe gewachsenen Kolonien eine andere Gestalt an. Die starren rankenförmigen Ausläufer werden immer kürzer, dünner und nehmen an Zahl zu; es bildet sich ein grauschwarzes, unregelmäßig rundes Zentrum, von dem feine, kurze, filzartige Fasern abgehen. Also auch die tiefen Kolonien nehmen nach und nach eine geschlossene, mehr rundliche Gestalt an.

Die 3 erhaltenen asporogenen Milzbrandstämme zeigten sich virulent und stimmten im übrigen vollkommen in morphologischer und kultureller Beziehung mit dem normalen sporenbildenden Milzbrand überein, wie auch Lehmann (62) und Behring (63) festgestellt haben. Die Lockenbildung ist deutlich ausgeprägt, im weiteren Verlauf nehmen die Agar-

kulturen der sporenlösen Milzbrandstämme ein homogenes Aussehen an und zeigen auch keine glasigen oder durchscheinenden Stellen, welche man in älteren sporenhaltigen Kulturen stets beobachten kann. In Ausstrichpräparaten von 10-tägigen bei 36° C gehaltenen Agarkulturen der sporenlösen Milzbrandstämme waren weder freie noch in den Stäbchen gelegene Sporen nachzuweisen. Die Stäbchen zeigten bizarre Involutionsformen und Zerfall durch Plasmolyse und Plasmoptyse. In den angelegten Platten gingen nach vorheriger Erhitzung des Aussaatmaterials $\frac{1}{2}$ Stunde lang auf 70° keine Milzbrandkolonien auf. Die Kulturen, welche von isoliert gewachsenen vaccinähnlichen Kolonien durch Abimpfen angelegt wurden, zeigten sich avirulent für Kaninchen und Meerschweinchen, während Mäuse bei reichlichem Impfmateriale mehrfach nach 3—5 Tagen an Milzbrand starben und ein ausgebreitetes Oedem an der Impfstelle zeigten. Außerdem war in den vaccinähnlichen Kulturen verzögertes Wachstum, mangelhafte Sporenbildung und massenhaftes Auftreten von Involutionsformen zu konstatieren. In morphologischer Beziehung bestand jedoch vollkommene Uebereinstimmung mit virulenten Milzbrandkulturen. Als ich die vaccinähnlichen Kulturen in der 4. Generation auf Agar durch Plattenaussaat auf das Aussehen der Kolonien prüfte, zeigten 2 derselben nicht mehr den geschlossenen Typus der Vaccinkolonien, sondern normales Milzbrandwachstum mit schön gelockten Kolonien. Nur an ganz vereinzelt Kolonien war die Lockenbildung undeutlich, und die Kolonien selbst geschlossen, so daß sie entfernt an das Aussehen der Vaccinkolonien erinnerten. Im übrigen war das Wachstum verlangsamt derart, daß erst nach 24 Stunden die aufgehenden Kolonien einigermaßen deutlich zu erkennen waren. Die geringe Virulenz blieb jedoch bestehen. Bei 3 abgeschwächten Milzbrandstämmen war jedoch das atypische Wachstum in Gestalt der geschlossenen, leicht gewellten Vaccinkolonien auch in den weiteren Generationen zu beobachten, dasselbe war also konstant geworden.

Aus den obigen Versuchen geht in Uebereinstimmung mit den Versuchen von R. Koch und seinen Mitarbeitern (l. c.), Sorbenheim (59) u. a. hervor, daß auf künstlichem Wege durch methodische Einwirkung desinfizierter Mittel chemischer und physikalischer Natur eine Abschwächung der Milzbrandbacillen herbeigeführt werden kann, welche außer dieser physiologischen Abänderung eine Verlangsamung und vorübergehende Veränderung im Wachstum zur Folge hat, die jedoch bleibend wird, wenn die schädigende Einwirkung längere Zeit anhält. Die Abweichungen der Vaccinstäbchen von morphologischer und kultureller Beziehung so auffallend, daß man erstere für eine andere Species halten könnte. Gamaleia (63) macht bereits darauf aufmerksam, daß die morphologischen und biologischen Unterschiede der Vaccins von den Milzbrandbacillen ebenso groß seien, als manche andere Differenzen bei Bakterien, die man gegenwärtig noch zum Unterschiede von Arten benutzt. Die künstlichen Abänderungen der normalen Wuchsform ist bei den höheren Pflanzen keine auffällige Erscheinung. Im Reiche der niederen Pflanzen, der Bakterien, hat man bisher an die Konstanz der Form gleich einem Gesetz festgehalten. Absolute Konstanz der Form gibt es aber auch bei den Bakterien nicht, wie die Involutions- und verschiedenen Wuchsformen einzelner Bakterien beweisen. Aber auch die morphologischen Abweichungen der Vaccinstäbchen kann nicht weiter auffallen, da die Gestalt der Milzbrandbacillen schon durch Passage

verschiedener Tierspecies stark beeinflußt werden kann. Beim Rinde, Schaf und bei der Ziege sind die Milzbrandbacillen in der Regel länger und dünner, wie bei der Maus. Martel (64) sah nach Passage des Milzbrandbacillus durch den Hundekörper keine Fadenbildung in Bouillonkultur mehr. In derselben zeigten sich nur kurze Stäbchenformen, die höchstens 4-gliedrige, kurze Verbände bildeten. Oft waren die Stäbchen so kurz, daß sie Kokken glichen.

Auch das von dem normalen Wachstum der Milzbacillen abweichende Aussehen der Kolonien der Pasteurschen Vaccinstäbchen wird nicht weiter überraschen können, da notwendigerweise der Verlust des Auswachsens zu langen Fäden in flüssigen Medien sich auch auf der Platte geltend machen muß, und die Folge davon ist das Ausbleiben der Haarlockenbildung, die Bildung von geschlossenen Kolonien. In dem Aussehen der Kolonien haben wir einen Maßstab für die Beurteilung des Abschwächungsgrades der Milzbrandbacillen.

Die Frage, ob die Vaccinstäbchen durch Passage der großen Haustiere wieder das typische Milzbrandwachstum annehmen können, konnte ich nicht entscheiden, da ich nicht die Gelegenheit hatte, ein im Verlaufe der Pasteurschen Milzbrandschutzimpfungen an Impfmilzbrand eingegangenes Schaf oder Rind zu sezieren und die tödliche Infektion bei einem Schafe mit Vaccinstäbchen mir nicht gelang. Ich habe mit demselben negativen Erfolge, wie Koch, Gaffky und Löffler (l. c.) versucht, die Virulenz des Pasteurschen Milzbrandvaccins No. 2 durch fortlaufende Tierpassage, und zwar zuerst durch Mäuse, dann durch Meerschweinchen und zuletzt durch Kaninchen mit neben einhergehender Züchtung in Bouillon, der ich frisches Schafblut zusetzte, zu erhöhen. Zuletzt starben die Kaninchen bei Verimpfung von 0,1 ccm 48-stündiger Bouillonkultur nach 48 Stunden. Aenderung des Aussehens der Vaccinkolonien war nicht eingetreten. Wenn nun die Beobachtung Chauveaus (75) richtig ist, wonach abgeschwächter Milzbrand in Bouillonkultur den Virulenzgrad für diejenige Tiergattung annimmt, deren Blut man der Bouillon vorher zugesetzt hat, so mußte die subkutane Impfung einer solchen Kultur einen Hammel töten. Allein es gelang mir nicht, eine tödliche Infektion bei einem einjährigen Hammel mit 15 ccm einer derartigen Bouillonkultur, dem Endprodukt der fortlaufenden Passage von je 5 Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen, herbeizuführen. Jedoch sei dem, wie ihm wolle, es ist ohne weiteres zuzugeben, daß die Möglichkeit der künstlichen Abschwächung von Milzbrandkulturen mit gleichzeitigem atypischen Wachstum die Bedeutung der charakteristischen Kolonie des virulenten Milzbrandes für die praktische Milzbranddiagnose nicht beeinträchtigen kann. Es ist namentlich in Betracht zu ziehen, daß die meisten Autoren, welche sich mit künstlicher Abschwächung beschäftigt haben oder spontan avirulent gewordene Milzbrandkulturen untersuchten, erwähnen, daß trotz des Verlustes der Virulenz Veränderungen in morphologischer und kultureller Hinsicht nicht zu konstatieren waren in gleicher Weise, wie dies Behring und Lehmann (l. c.) bei dem sporenlösen Milzbrand feststellen konnten. Aber auch selbst wenn man ein natürliches Vorkommen von derartig abgeschwächtem Milzbrand mit atypischem Wachstum in Sporenform annehmen wollte, dürfte eine Infektion mit demselben bei unseren Haustieren vom Darmkanal aus als sehr fraglich erscheinen. Ich habe einem Hammel 6 sporenhaltige Kulturen der hochgezüchteten

Stäbchen von Vaccin II per os eingegeben, ohne daß das Tier irgendwelche Krankheits Symptome oder Temperatursteigerung zeigte. Andererseits ist eine Abschwächung des Milzbrandes in der Sporenform, in welcher er sich im Erdboden befindet, undenkbar. Die Sporen sind die Dauerform und bewahren die Virulenz, welche die Bacillen besaßen, aus denen sie entstanden sind.

Ich habe nun die anderen Methoden der Abschwächung des Milzbrandbacillus, welche den natürlichen Verhältnissen entsprechen, auf ihren Einfluß auf das Aussehen der Milzbrandkolonien untersucht und zwar die Besonnung sporenhaltiger Kulturen (Arloing [66]), die Passage durch den Organismus milzbrandimmuner Tiere und die Einwirkung von Fäulnis- und Bakterientoxinen auf Milzbrandbacillen und Sporen.

Drei 4-tägige Agarplatten mit getrennt aufgegangenen Milzbrandkolonien und reichlicher Sporenbildung setzte ich an 3 aufeinanderfolgenden Tagen bei ständig klarem Himmel von morgens 10 Uhr bis nachmittags 5 Uhr den senkrechten Strahlen der Julisonne aus. Nach somit 21-stündigem Besonnen prüfte ich die Lebensfähigkeit der Milzbrandkolonien durch Plattenaussaat. Ich übertrug von jeder Platte je 2 ganze Milzbrandkolonien in flüssigen Agar und goß diesen ohne Verdünnung zur Platte aus. Nach 48-stündigem Aufenthalt im Brutschrank zeigten sich 3 Platten steril, in 2 Platten gingen ca. 50 Kolonien und in 1 Platte 5 Kolonien mit typischem Milzbrandwachstum auf. Die Verimpfung der aufgegangenen Milzbrandkolonien, 1 Oese an 1 Meerschweinchen und 2 Mäuse hatte den Tod der Tiere innerhalb 24—48 Stunden zur Folge. Durch die Insolation nach der Arloing'schen Methode wird also keine Abschwächung der Milzbrandbacillen bis zur Avirulenz, sondern ein allmähliches Absterben der lebensfähigen Milzbrandkeime herbeigeführt.

Sodann impfte ich mehrere große Frösche mit virulentem Milzbrandmaterial, und zwar 2 mit sporenhaltiger Kultur in den Rückenlymphsack und bei 2 führte ich in letzteren die stark bacillenhaltige Milz von Milzbrandmäusen ein. Bei der nach 7, 9, 13 und 15 Tagen vorgenommenen Tötung konnte ich feststellen, daß die Zahl der auf der Platte aufgehenden Milzbrandkolonien allmählich abnahm, eine Aenderung im typischen Aussehen derselben trat jedoch nicht ein. In den Ausstrichpräparaten der eingebrachten Mäusemilz fanden sich neben schlecht gefärbten Milzbrandstäbchen in größerer Zahl Involutionsformen derselben, namentlich viele an beiden Enden ähnlich einer Cigarre zugespitzte Stäbchen, außerdem in geringer Zahl vollkommen intakte, gut gefärbte Milzbrandbacillen mit schöner Kapsel (Phot. 4). In den Ausstrichen der Impfstelle der mit Kultur geimpften Frösche befanden sich einzelne freie Sporen und sporenhaltige, in Zerfall begriffene Milzbrandstäbchen. Die Kulturen aus dem Herzblut von 4 Fröschen blieben steril. 2 Mäuse, welche mit den Milzbrandkolonien geimpft wurden, welche aus den in den Lymphsack eingebrachten und 13 Tage lang darin verbliebenen Milzen aufgegangen waren, starben nach 24—36 Stunden, desgleichen auch ein Meerschweinchen. Es ist somit der Beweis erbracht, daß durch die Passage der milzbrandimmunen Frösche keine Abschwächung der Milzbrandbacillen herbeigeführt wird, wie man bisher angenommen hat, sondern daß nur eine nach und nach erfolgende Abtötung durch Behinderung des Wachstums stattfindet, wie von Lubarsch (67) bereits festgestellt wurde, und daß durch den Auf-

enthalt im Organismus milzbrandimmuner Tiere das Wachstum der überlebenden Milzbrandbacillen eine Aenderung von der Norm nicht erfährt.

Endlich untersuchte ich, ob durch die Einwirkung der verschiedensten Bakterien eine Abschwächung der Milzbrandbacillen und damit eine Veränderung im Wachstum auf der Platte herbeigeführt wird. Ich habe aber bei den vielfachen Untersuchungen in dieser Richtung eine Virulenzabnahme für kleine Versuchstiere und eine Anomalie im Wachstum nicht feststellen können. Solange ein lebensfähiger Milzbrandkeim noch vorhanden ist, kann man auch auf das Aufgehen einer typischen Milzbrandkolonie rechnen. Ich habe Milzbrandsporen in faulendem Blute aufgeschwemmt und ca. 1 Jahr lang in verkorkten Flaschen aufbewahrt, aber eine Abnahme der Virulenz und eine Veränderung im Wachstum nicht konstatieren können.

Ich glaube somit bewiesen zu haben, daß das bekannte Aussehen der Milzbrandkolonien charakteristisch und konstant ist, und daß dasselbe einen sicheren Anhalt für den Nachweis des Milzbrandes für die Fälle der Praxis gewährt.

Untersuchungen über die zweckmäßigste Art der Aufbewahrung von Milzbrandmaterial.

In dem ersten Teil der Arbeit, der Untersuchung über den Nachweis der Milzbrandbacillen, hatte ich bereits darauf hingewiesen, daß die gebräuchlichen Methoden der Aufbewahrung von Milzbrandmaterial auf den bakteriologischen Nachweis nur eine nebensächliche Bedeutung besitzen, und daß es hauptsächlich auf die mehr oder minder zahlreich vorhandenen sekundären Bakterien und auf die Außentemperatur ankommt. Sind die beiden letzten Bedingungen gegeben, dann ist keine der bisher gebräuchlichen Methoden im stande, die Fäulnisprozesse auch nur auf kürzere Zeit aufzuhalten. Am lebhaftesten werden sich diese in dem halbflüssigen Material einer Flasche entfalten können, andererseits wird ein kompaktes Milzstück, welches oberflächlich eintrocknen kann, weniger leicht und schnell Fäulnisprozessen anheimfallen. Aber auch das von Olt (l. c.) empfohlene Beschieken der Durchbruchfläche einer gekochten Kartoffel mit etwas Milzbrandmaterial hat nur dann den beabsichtigten Erfolg der Vermehrung und Sporenbildung der Milzbrandbacillen, wenn das Material frisch und einigermaßen rein ist. Sobald die Besäung der Kartoffel am 2.—3. Tage nach dem Tode des Tieres bei hoher Außentemperatur erfolgt, werden die Milzbrandbacillen von den Fäulnisbakterien überwuchert und unterdrückt, die Vermehrung und Sporenbildung bleibt aus, die Milzbrandbacillen gehen in kurzer Zeit zu Grunde. Ich habe feststellen können, daß in faulendem Material der Milzbrandbacillus in der Regel trotz hoher Außentemperatur und freiem Luftzutritt keine Sporen bildet, sondern zu Grunde geht. Ich komme hierauf noch eingehender zurück.

Von der Tatsache ausgehend, daß in Reinkulturen der Milzbrandbacillus nach Verlauf von 24 Stunden bereits Sporen bildet, glaubte ich im Anfang, daß auch die Milzbrandbacillen aus dem Kadaver auf improvisierten, überall leicht zu beschaffenden Nährsubstraten wachsen und bei sachgemäßem Transport in der Rocktasche unter dem Einfluß der Körperwärme auch Sporen bilden würden. Ich machte nun verschiedene Versuche mit Milch, welche ich in Reagenzröhrchen unter ständigem Umschütteln mehrere Minuten lang über der Flamme kochte und nach

dem Abkühlen mit Milzbrandmaterial impfte. Weiterhin brachte ich frisches Hühnereiweiß auf der Mitte eines flambierten Objektträgers zum Gerinnen und legte auf diesem festen Nährboden mehrere Impfstrieche an. Alsdann trug ich diese Röhrchen und Objektträger sorgsam verpackt 1—1½ Tage bei mir, wenn die Außentemperatur unter 20° stand. Aber alle diese Versuche schlugen fehl, wie bei der Oltischen Methode; sobald das Material Fäulniskeime enthielt, wurden die Milzbrandbacillen überwuchert. Im Gegenteil, diese Versuche leisteten unter diesen Verhältnissen weniger, wie die gewöhnlichen Aufbewahrungsmethoden. Es mußte daher meine Aufgabe sein, eine Konservierungsmethode ausfindig zu machen, vermöge deren die Milzbrandbacillen im faulenden Material von der schädlichen Konkurrenz der Fäulniskeime befreit werden, so daß sie für längere Zeit ihre Lebensfähigkeit bewahren können. Würde es sich nur um Erhaltung der Form der Milzbrandbacillen mit Rücksicht auf die Möglichkeit des morphologischen Nachweises in Ausstrichpräparaten handeln, so könnte man dieses sehr gut durch Zusatz von 1⁰/₁₀₀ Sublimatlösung zu abgestrichener Milzpulpa oder Blut in einer Flasche erreichen. Wie festes Gewebe, so werden auch hier die zelligen Elemente und die Bakterien in dem flüssigen Medium in dem Zustande, in welchem sie sich augenblicklich befinden, fixiert, die Fäulnis sistiert und intakte Milzbrandbacillen lassen sich auf diese Weise noch nach Wochen erkennen. Da wir mit Rücksicht auf den erforderlichen biologischen Nachweis der Milzbrandbacillen auf die Lebensfähigkeit derselben nicht verzichten können, hat die Konservierung mit Sublimat oder einem sonstigen Fixierungsmittel keinen praktischen Wert für unsere Zwecke.

Die Fäulnisprozesse, welche die Milzbrandbacillen zerstören, sind an einen gewissen Grad von Feuchtigkeit gebunden. Das Gesetz „Corpora non agunt nisi fluida“ hat nicht nur für die chemischen Prozesse Gültigkeit, sondern dasselbe ist auch *conditio sine qua non* für jedes organische Leben, welches es auch sein mag, so auch für das Wachstum der Bakterien, z. B. die Fäulnisprozesse. Es lag also nichts näher, als das Milzbrandmaterial eintrocknen zu lassen und zu sehen, wie lange sich die Milzbrandbacillen im eingetrockneten Zustande lebensfähig erhalten. Ich trug zu dem Zwecke die abgestrichene Milzpulpa in dicker Schicht auf Objektträger auf, wobei der Rand und die beiden Enden freigelassen wurden, und ließ das Material in der Rocktasche, durch zweckmäßiges Verpacken genügend gesichert, bei Zimmertemperatur und im Eisschrank langsam eintrocknen. Es war nun festzustellen, wie lange unter diesen Verhältnissen der Milzbrandbacillus seine Lebensfähigkeit und sein Fortpflanzungsvermögen bewahrt. Durch viele Versuche habe ich nun konstatieren können, daß der Milzbrandbacillus in dicker Schicht auf Objektträgern eingetrocknet, in der Regel 10—14 Tage, mitunter aber 3 Wochen und noch länger sich lebens- und entwicklungsfähig erhalten kann. In dem eingetrockneten Zustande erfolgt ein ganz allmähliches Absterben der Milzbrandbacillen. Hiervon kann man sich durch periodisch vorgenommene Plattenaussaat überzeugen. Die Zahl der aufgehenden Kolonien nimmt immer mehr ab, die Verwendung gleicher Mengen des eingetrockneten Materials zur Plattenaussaat vorausgesetzt, bis schließlich selbst bei reichlicher Aussaat keine einzige Milzbrandkolonie mehr aufgeht. Hieraus ist zu folgern, daß die Eintrocknung von reichlichem Ausgangsmaterial in dicker Schicht eher die Aussicht auf einen für längere Zeit ermöglichten Nachweis der Milzbrandbacillen gewährt, als in dünner Schicht. Bei der größeren Anzahl

der Milzbrandbacillen in dicker Schicht ist eher mit dem Vorhandensein von lebensfähigen Bacillen zu rechnen, welche den schädlichen Einflüssen der Eintrocknung längere Zeit widerstehen. Aus demselben Grunde ist auch der Nachweis im bacillenreichen, eingetrockneten Material länger möglich, wie im bacillenarmen. Ich glaubte anfangs, daß für das Gelingen einer möglichst langen Konservierung der Milzbrandbacillen auf das Ausstreichen in dicker Schicht der Nachdruck zu legen sei, und habe dies auch in der vorläufigen Mitteilung im 7. Heft des XII. Jahrganges der Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene, worin ich diese Methode als zweckmäßig für die Aufbewahrung von Milzbrandmaterial zum Zwecke des späteren Nachweises empfahl, zum Ausdruck gebracht. Das Ausstreichen in dicker Schicht hat aber nach den obigen Ausführungen im Prinzip nur eine nebensächliche Bedeutung, sie empfiehlt sich aber, da hierdurch die Eintrocknung und Fixierung möglichst vieler Milzbrandbacillen am sichersten und zweckmäßigsten erreicht wird. Bezüglich der Möglichkeit des Nachweises würde man dasselbe erreichen können, wenn die gleiche Menge Material in dünner Schicht ausgestrichen würde. Durch Parallelversuche konnte ich nachweisen, daß in größerer Fläche dünn ausgestrichenes Milzbrandmaterial ebenso lange den Nachweis der Milzbrandbacillen in der Platte gestattete, wie die dick mit demselben Material bestrichenen Objektträger, vorausgesetzt, daß dieselbe Menge eingetrockneten Materials zur Aussaat verwandt wurde. Auch die Art der Eintrocknung, ob bei hoher oder niedriger Außentemperatur, ob langsam oder schnell, ist belanglos. Eine verzögerte Eintrocknung, z. B. durch Behinderung der Verdunstung herbeigeführt, kann unter Umständen bei günstiger Temperatur Sporenbildung ermöglichen, wenn das Material frisch ist. In den meisten Fällen wird aber die verzögerte Eintrocknung den beabsichtigten Zweck der möglichst langen Konservierung durch Sporenbildung vereiteln, da eine Ueberwucherung durch Fäulniskeime hierdurch begünstigt wird. Die Annahme, daß eine allmähliche, spontane Eintrocknung die Lebensfähigkeit der Milzbrandbacillen weniger schädigt, wie eine schnell erfolgende, trifft nicht zu. Bei schnell herbeigeführter Eintrocknung im Exsikkator über Chlorcalcium oder Schwefelsäure blieben die Milzbrandbacillen ebenso lange lebensfähig, wie bei spontaner Eintrocknung.

Bei der Konservierung der Milzbrandbacillen durch Eintrocknung habe ich nur in einem Falle unter vielen Versuchen Sporenbildung nachweisen können. Um die Zuverlässigkeit der Methode des Eintrocknens von Milzbrandmaterial auf Objektträgern zu erhöhen, versuchte ich mehreremal nach der Buchnerschen Methode durch Hinzufügen von Aqua dest. oder 2-proz. NaCl-Lösung in dem Objektträgermaterial Sporenbildung herbeizuführen. Die Versuche in dieser Richtung mißlingen jedoch alle, da, wie bei der verzögerten Eintrocknung eine schnelle Ueberwucherung mit Fäulniskeimen wegen des hohen Feuchtigkeitsgehaltes eintrat.

Die Dauer der Möglichkeit des Nachweises der Milzbrandbacillen im getrockneten Zustande hängt von der Menge der lebensfähigen Bacillen ab, welche zur Eintrocknung gebracht worden sind. Da nun im Kadaver die Zahl der lebensfähigen Milzbrandbacillen rasch abnimmt, wird man also um so länger in dem eingetrockneten Objektträgermaterial lebensfähige Milzbrandbacillen nachweisen können, je früher nach dem Tode des Tieres das Milzbrandmaterial durch Eintrocknen fixiert wurde, während umgekehrt das eine Zeit nach dem Tode entnommene und zum

Eintrocknen gebrachte Untersuchungsmaterial nur eine beschränkte Anzahl von Tagen länger den Nachweis der Milzbrandbacillen ermöglichen wird, wie das Ursprungsmaterial. In allen Versuchen habe ich nun feststellen können, daß bei vollkommen negativen Befunden des nicht eingetrocknet aufbewahrten Ausgangsmaterials, in welchem Milzbrandbacillen kulturell nicht mehr nachzuweisen waren und Deckglasausstriche schon längst im Stiche ließen, in der Regel noch 8 Tage später und noch länger in den mit dem eingetrockneten Material besäten Platten makroskopisch erkennbare Milzbrandkolonien aufgingen (s. Tab.). Die Herstellung von Verdünnungen hat sich dabei als überflüssig herausgestellt, da die Milzbrandkolonien ohne solche ebenfalls isoliert aufgehen. Das Anlegen der Plattenkulturen vereinfacht sich hierdurch ganz bedeutend, es erfordert keine besonderen technischen Fertigkeiten und ist den praktischen Verhältnissen angepaßt. Man schabt das auf dem Objektträger eingetrocknete Material möglichst fein mit einem flambierten Messer in eine sterile Petrische Doppelschale und gießt verflüssigten und wieder auf 43° abgekühlten Agar über die zerkleinerten Milz- oder Blutpartikelchen. Innerhalb 24 Stunden sieht man alsdann meistens isolierte Milzbrandkolonien aufgehen, welche aus den kleinen Partikelchen des Aussaatmaterials hervorwachsen. Ist jedoch die Entnahme der Milzbrandprobe spät nach dem Tode des Tieres erfolgt und eine starke Verunreinigung mit Fäulniskeimen vorhanden, so ist die Herstellung einer Aufschwemmung des eingetrockneten Untersuchungsmaterials in sterilere Flüssigkeit erforderlich, in welchen sich die trockenen Milz- oder Blutpartikelchen bald auflösen. Diese Aufschwemmung verteilt man auf eine größere Anzahl steriler Petrischen Schalen, gießt verflüssigten Agar herüber und vermischt letzteren mit der Aussaatflüssigkeit.

Als Material zur Eintrocknung zwecks späterer bakteriologischer Prüfung empfiehlt sich Milzpulpa und bei vorgeschrittener Fäulnis Halsvenenblut gemäß dem von Kitt gemachten und begründeten Vorschlage.

Nach meiner vorläufigen Mitteilung in der Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene erschien in dem Doppelheft 3/4 des XXVII. Bandes des Archivs für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde eine Arbeit von Hosang, welcher ebenfalls das Eintrocknen von Milzbrandmaterial in dicker Schicht an Objektträgern als ein zweckmäßiges Verfahren zur Aufbewahrung behufs späterer bakteriologischer Untersuchung empfahl. Die Prüfung der Zweckmäßigkeit des Verfahrens erstreckte sich nur auf die mikroskopische Untersuchung und die Impfung, den kulturellen Nachweis hat Hosang außer acht gelassen. H. konnte mit 24 und 48 Stunden alten eingetrockneten Blut- und Milzproben, welche 4 Tage nach dem Tode einem an Impfmilzbrand eingegangenen Meerschweinchen oder einer Maus entnommen wurde, durch Impfung von Mäusen den Nachweis von Milzbrandbacillen führen. Mit Sicherheit gelang H. der Nachweis der Milzbrandbacillen bei seiner Versuchsanordnung bis zum 6. Tage nach dem Tode des Meerschweinchens bzw. der Maus, von da an erfolgte der Tod der Impfmäuse an Milzbrand unregelmäßig, oder die Impfung versagte ganz.

Die wenigen Untersuchungen von H. an kleinen Versuchstieren gestatten jedoch keinen Rückschluß auf ähnliche Verhältnisse bei den großen Haustieren, auf die es doch in der Praxis allein ankommt. Zunächst sind die Fäulnisprozesse bei unseren großen Haustieren ganz anderer Art, sie verlaufen viel lebhafter und schneller, wie bei den kleinen Versuchstieren. Dazu kommt noch, daß letztere nach dem Tode sehr bald

auskühlen, wodurch die Fäulnisprozesse aufgehalten werden, während in den großen uneröffneten Tierkadavern wegen des größeren Umfanges ein Auskühlen nur sehr langsam erfolgt und sehr bald stinkende Fäulnis eintritt. Während in uneröffneten Milzbrandkadavern der großen Haustiere schon innerhalb 24—48 Stunden durch die Fäulnis die Milzbrandbacillen vernichtet werden können, gelingt der Nachweis bei uneröffneten Milzbrandmäusen, wie bereits erwähnt, in Ausstrichpräparaten und durch die Plattenkultur in der Regel noch 8—10 Tage nach dem Tode, also ebenso lange und noch länger, wie Hosang in dem eingetrockneten Milzbrandmaterial von Mäusen und Meerschweinchen nachweisen konnte. Die Versuchsergebnisse von H. können auch aus dem Grunde als strikter Beweis für die längere Lebensfähigkeit der Milzbrandbacillen im eingetrockneten Zustande, als wie im Kadaver, selbst nicht angesehen werden, da H. gleichzeitig auszuführende Untersuchungen an den Versuchstieren selbst, denen er das Material zum Eintrocknen entnahm, nicht vorgenommen hat. Auch ist H. auf das Wesen der Eintrocknung selbst nicht eingegangen. Ein Vergleich meiner Versuchsergebnisse mit denen von H. läßt aber gerade den Wert des Plattenverfahrens gegenüber der Impfung besonders hervortreten.

Aus meinen Versuchen über die Nachweisbarkeit der Milzbrandbacillen im eingetrockneten Milzbrandmaterial geht hervor, daß dieselben sich bedeutend länger lebensfähig erhalten, als wie man bisher angenommen hat. Voraussetzung dazu ist, daß die Milzbrandbacillen vor der schädlichen Einwirkung der Fäulnisbakterien geschützt werden, und das geschieht am sichersten im eingetrockneten Zustande.

Auf die lange Lebensfähigkeit der Milzbrandbacillen im eingetrockneten Zustande hat zuerst, soweit ich aus der Literatur entnehmen konnte, Momont (68) hingewiesen. Als ich die Eintrocknung von Milzbrandmaterial auf ihre Zweckmäßigkeit für eine später vorzunehmende Untersuchung prüfte, kannte ich die Arbeit von Momont noch nicht. Ich hielt mich an die in den meisten Lehrbüchern über die Lebensfähigkeit der Milzbrandbacillen enthaltenen Angaben, wonach die Milzbrandbacillen eine sehr geringe Tenazität gegenüber äußeren Einflüssen besitzen und bald zu Grunde gehen, während die Milzbrandsporen äußerst resistent sind. R. Koch (l. c. p. 50 u. 243) gibt an, daß die Milzbrandbacillen in dauernd trockenem Zustande sich nur kurze Zeit lebensfähig erhalten können. Momont konnte experimentell nachweisen, daß der Milzbrandbacillus im eingetrockneten Zustande sich bis zum 57. Tage lebensfähig erhalten kann. Auf die Momontsche Arbeit scheint sich auch die im Kittschen Lehrbuch, 3. Aufl., p. 271, befindliche Fußnote und die in der Friedberger und Fröhnerschen Pathologie und Therapie der Haustiere, 4. Aufl., p. 478, enthaltene Angabe zu beziehen, wonach Milzbrandbacillen bis zum 60. Tage virulent bleiben können. Momont stellte seine Versuche derart an, daß er sofort nach dem Tode eines an Milzbrand gestorbenen Kaninchens 1—2 Tropfen Herzblut auf dem Boden von sterilen Reagenzröhrchen ausstrich, im Exsikkator über Schwefelsäure schnell zum Eintrocknen brachte und bei 16—22° und bei 33° bei Gegenwart von Luft und im Vakuum aufbewahrte. Alle 2 Tage wurde zu je einem Röhrchen Bouillon gefügt und festgestellt, ob der Milzbrandbacillus auswächst. Bei Zimmertemperatur und Luftzutritt lebte der Milzbrandbacillus 57 Tage. Die erhaltenen Kulturen gingen oft erst nach 24 Stunden an. Eine Abschwächung vor dem Tode war aber nicht eingetreten, denn die erhaltenen Kulturen töteten ein Meer-

schweinen in 30 Stunden. Bei 33° und Luftzutritt lebten die Bacillen 45 Tage. An Seidenfäden eingetrocknet, hielten sich die Milzbrandbacillen bis zu 70 Tagen entwicklungsfähig, ohne daß Abschwächung erfolgte. Ich habe die Momontschen Versuche des Eintrocknens sterilen Milzbrandblutes in Reagenzröhrchen nachgeprüft und kann im großen und ganzen das Resultat derselben bestätigen. M. glaubte durch die schnelle Eintrocknung im Exsikkator die Sporenbildung auszuschließen, obwohl er den Beweis hierfür nicht geführt hat. Durch negative Kulturergebnisse mit der Hälfte einer Aufschwemmung des auf dem Boden des Röhrchens eingetrockneten Bluttröpfens nach vorheriger Erhitzung eine Stunde auf 70°, während die andere, nicht erhitzte Hälfte der Aufschwemmung eine Milzbrandkultur lieferte, konnte ich mich in mehreren Fällen überzeugen, daß in der Tat bei dieser schnellen Eintrocknung eine Sporulation der Milzbrandbacillen nicht möglich ist. Bei einer von 5 Versuchsreihen gelang mir der Nachweis der Milzbrandbacillen bis zum 51. Tage, in den 4 anderen bis zum 35.—40. Tage. Mehrfach konnte ich konstatieren, daß oft schon vom 20. Tage an ganz unregelmäßig einzelne Röhrchen steril blieben, während andere derselben Versuchsreihe noch eine ganze Anzahl von Tagen später eine Milzbrandkultur lieferten. Es kann diese Erscheinung nach den obigen Ausführungen nicht weiter auffallen, da das Absterben der Milzbrandbacillen im eingetrockneten Zustande nicht etwa auf einmal erfolgt, sondern ganz allmählich, worüber allerdings die Bouillonkultur keinen Aufschluß geben kann, weil ein lebensfähiger Milzbrandbacillus ebensogut eine Kultur erzeugen wird wie 100 Bacillen, wenn auch etwas später, wohl aber die Plattenkultur. Diese allmähliche Abnahme der Zahl der lebensfähigen Milzbrandbacillen erklärt auch das späte Angehen der Kultur; es wäre unrichtig, hieraus auf eine Abnahme der Keimfähigkeit der Milzbrandbacillen zu schließen, zumal die Kulturen, wie Momont hervorhebt, sich vollkommen virulent zeigten. Ueber die Art des Absterbens hat Momont keinen Ueberblick gewinnen können, da er seine Kulturversuche in der aufgefüllten Bouillon nicht durch Plattenaussaat auf die Zahl der aufgehenden Kolonien kontrolliert hat. Sodann ist noch in Betracht zu ziehen, daß Momont die Wirkung der Eintrocknung nur an sterilem, frischem Milzbrandmaterial geprüft, dieselbe an faulem Material jedoch nicht entschieden hat.

Erklärung der Photogramme.

- Phot. No. 1. Oedembacillen mit Kapseln aus 48-stündigem Milzbrandmaterial (Kuh No. 2).
 Phot. No. 2. Milzbrandbacillen aus der Milz vom Rind No. 10, 8. Tag.
 Phot. No. 3. Oedembacillen mit deutlicher Kapsel aus der Milz von einem an Bauchfellentzündung gestorbenen Rinde.
 Phot. No. 4. Oberflächliche Milzbrandkolonie.
 Phot. No. 5. Tiefe Milzbrandkolonie.
 Phot. No. 6. Oberflächliche milzbrandähnliche Kolonie.
 Phot. No. 7. Tiefe milzbrandähnliche Kolonie.
 Phot. No. 8. Tiefe Milzbrandkolonie in einem Gemisch von Fäulnisstäbchen.
 Phot. No. 9. Tiefe Kolonie von Fäulnisstäbchen.
 Phot. No. 10. Kolonie von Pasteurschem Vaccin II.
 Phot. No. 11. Abgeschwächter Milzbrand, 4mal übergeimpft nach Phisalix; 28 Tage bei 42—43°.
 Phot. No. 12. Milzbrandkolonie aus Hühnerbouillon, 38 Tage bei 42—43° gehalten. Uebergang zum Geschlossenwerden der Kolonie.
 Phot. No. 13. Abgeschwächte Milzbrandkolonie aus karbolisierter 30-tägiger Bouillonkultur, 8 Tage bei Brüttemperatur von 37°, 22 Tage lang bei 42—43° gehalten. Vollkommen vaccinnählich.

Phot. No. 14. Abgeschwächter Milzbrand, nach der Methode Surmont-Arnould hergestellt. Vollkommen geschlossene Kolonie, nur noch pathogen für Mäuse.

Die Photogramme No. 1, 2 und 3 sind mit Oelimmersion Zeiss 2 mm, Proj.-Okular No. 4 bei gleichbleibendem Kammerauszug aufgenommen, Phot. No. 4 mit Obj. Zeiss 8 mm, Proj.-Okular No. 2 und die übrigen Photogramme mit Obj. Zeiss 16 mm, Proj.-Okular No. 2.

(Fortsetzung folgt.)

Nachdruck verboten.

**Bemerkungen zu dem Artikel von Prof. H. Bonhoff:
„Zum Streit um den Meningococcus“ (Centralbl. f. Bakt. etc.
Abt. I. Orig. Bd. XXXIV. No. 2. p. 143).**

[Aus dem pathol.-anatom. Institute in Wien (Prof. A. Weichselbaum).]

Von Prof. H. Albrecht und Prof. A. Ghon.

In dem oben genannten kurzen Aufsatz sah sich Bonhoff veranlaßt, einen „Irrtum“ richtig zu stellen, der sich in unseren Arbeiten über den *Micr. mening. c.-sp.* findet. Diesen Irrtum haben wir dadurch begangen, daß wir 1) in unserer Arbeit vom Jahre 1901 (Wiener klin. Wochenschr. No. 41) sagten: „. . . . Der Umstand, daß die Kahmhautbildung in Fleischbrühekultur niemals erwähnt wird . . .“ und daß wir 2) in der Entgegnung auf Jaegers Angriff (Centralbl. für Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII) sagten: „. . . . der die allerdings neue Beobachtung der Kahmhautbildung in Fleischbrühekulturen bringt . . .“ Demgegenüber stellte nunmehr Bonhoff fest, daß er in seiner Arbeit vom Jahre 1901 (Münch. medizin. Wochenschr. No. 3), die „³/₄ Jahr“ vor unserer erstgenannten erschienen war, der Kahmhautbildung in Fleischbrühekulturen des *Micr. mening. c.-sp.* bereits Erwähnung getan hat.

Diese von Bonhoff festgestellte Tatsache ist ohne weiteres richtig.

Wir bedauern lebhaft, diese „unzweifelhafte Tatsache“ in unseren Arbeiten nicht besonders hervorgehoben zu haben, sind aber leider heute nicht mehr in der Lage, sicher angeben zu können, welchem Umstände wir es zuschreiben müssen, daß die Würdigung dieser Tatsache von uns seinerzeit unterlassen wurde.

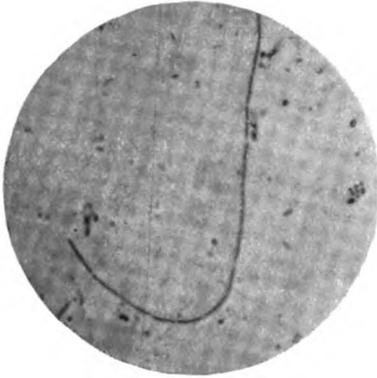
Bonhoff selbst erscheint diese Angelegenheit — wie er ausdrücklich sagt — nicht „von großer Wichtigkeit“, er will die „unzweifelhafte Tatsache“ nur ihrer selbst wegen festgestellt wissen.

Dieser Meinung Bonhoffs, daß die Angelegenheit wirklich nicht von „großer Wichtigkeit“ sei, möchten wir uns vollkommen anschließen, sehen uns aber nunmehr gleichfalls genötigt, hier eine „unzweifelhafte Tatsache“ festzustellen, die möglicherweise den von uns begangenen „Irrtum“ als entschuldbar finden lassen dürfte.

Diese Tatsache ist folgende:

Wie aus Weichselbaums Arbeit: „Ueber die literarischen Schicksale des „*Diplococcus intracellularis meningitidis*“ und seine ätiologische Bedeutung“ (Centralbl. für Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIII. 1903. p. 525) hervorgeht, gab die Verwirrung, die vorwiegend durch Jaeger in die Frage über die Aetiologie der epidemischen Genickstarre gebracht worden war, Veranlassung, daß uns

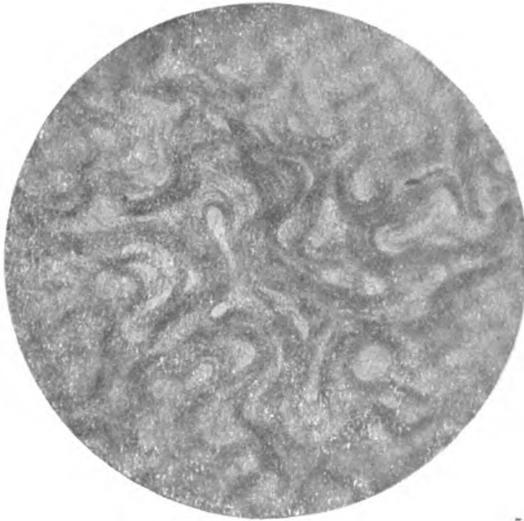
1



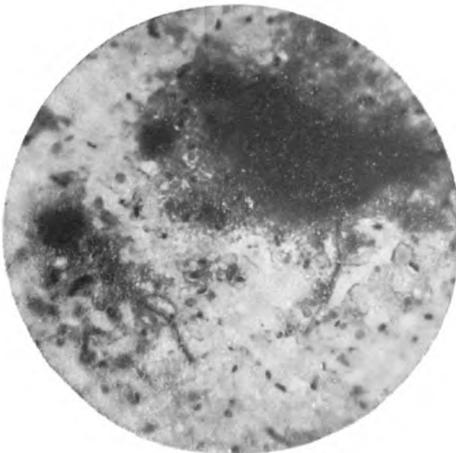
3



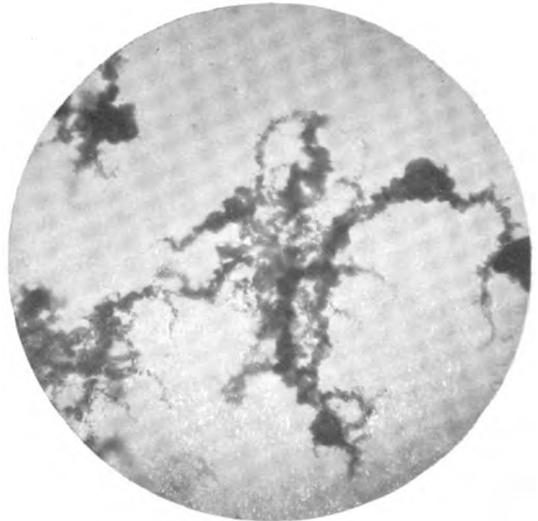
4



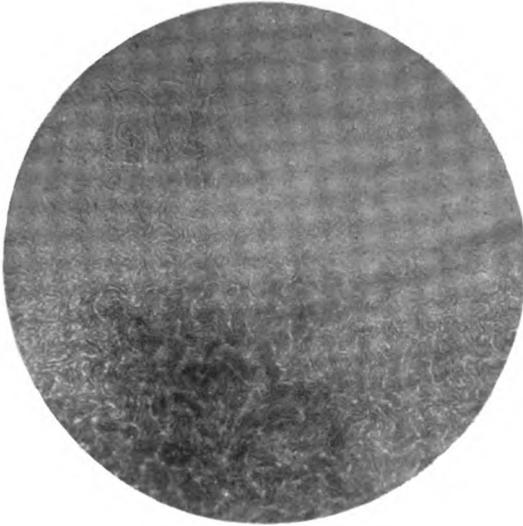
2



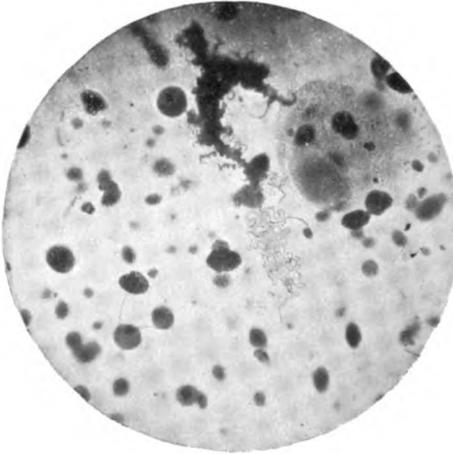
5



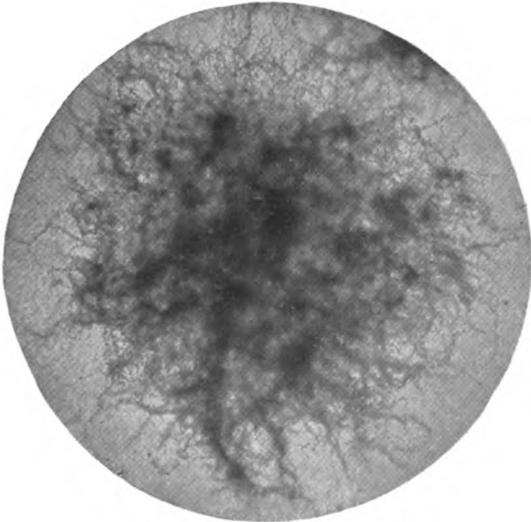
6



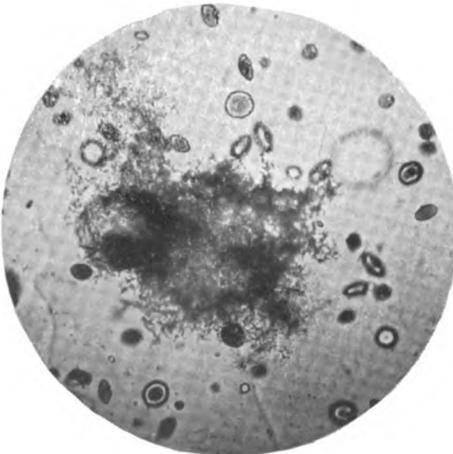
8



7



9



Weichselbaum eine Neubearbeitung dieser Frage übertrug. Wir nahmen diese Arbeit, wie gleichfalls aus dem zitierten Artikel Weichselbaums und auch aus unserer Arbeit vom Jahre 1901 hervorgeht (p. 5 des Sonderabdruckes) bereits im Jahre 1896 auf und verfügten schon in diesem Jahre über eine ganz ansehnliche Anzahl einschlägiger Fälle — 12 — die es uns ermöglichten, alle biologischen Eigenschaften des *Micr. mening. c.-sp.* kennen zu lernen.

Das war also im Jahre 1896, 4 Jahre früher als Bonhoff seinen Fall von Genickstarre zu untersuchen Gelegenheit hatte.

Auf Grund dieser in seinem Institute ausgeführten Untersuchungen hat Weichselbaum, der in seiner grundlegenden Arbeit über den Erreger der epidemischen Genickstarre (Fortschritte der Medizin. 1887) die Kahnhautbildung in Fleischbrühekulturen nicht erwähnt — und wie er uns zu erklären ermächtigt — auch nicht beobachtet hatte, die genannte Eigentümlichkeit des *Micr. mening. c.-sp.*, in Fleischbrühekulturen ein Oberflächenhäutchen zu bilden, neben anderen nicht gekannten und bis dahin auch nicht erwähnten Eigentümlichkeiten dieses Coccus auch in seine „Parasitologie“ aufgenommen (p. 132).

Dieses Werk Weichselbaums ist im Jahre 1898 bei G. Fischer in Jena (Handbuch der Hygiene von Th. Weyl) erschienen, 2 Jahre früher als Bonhoff seinen Fall zu untersuchen Gelegenheit hatte und 3 Jahre früher als Bonhoff seine im Jahre 1900 gemachte Beobachtung der Kahnhautbildung gedruckt sah.

Auf einige unserer Meinung nach unnötige und unsachliche Bemerkungen in dem Aufsätze des Herrn Bonhoff wollen wir nicht reagieren.

Nachdruck verboten.

Der Schildkrötentuberkelbacillus, seine Züchtung, Biologie und Pathogenität.

[Aus dem anatom.-biologischen Institut der Universität Berlin (Direktor: Herr Geh. Rat Prof. Dr. Hertwig).]

Von Dr. Friedrich Franz Friedmann, Berlin.

Mit 1 Tafel.

(Schluß.)

17) Eidechse. 20. April 1903. R.K. Schkr. T.B. intraperitoneal. 30. April tot. Käsiges Knötchen mit zahllosen T.B. auf der Oberfläche der Lungen, des Darmes, sowie in der Leber. Mikroskopisch: Leber in fettiger Degeneration begriffen; kolossale Vermehrung der T.B. in diesem Organe, namentlich in helleren, in Verkäsung begriffenen Knötchen enorme Bacillenmassen; in größeren Bacillenanhäufungen finden sich außer den ganz säurefesten roten auch rotblau und blau gefärbte Individuen; auch in größeren Blutgefäßen der Leber sehr zahlreiche T.B. Hoden: In den interstitiellen Räumen, sowie in größeren Blutgefäßen finden sich massenhafte T.B., aber auch in den Samenkanälchen selbst, und zwar im Lumen derselben mitten zwischen Spermatozoen wurden T.B.-Häufchen gesehen.

e) 9 Frösche.

18) Frosch. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 17. Jan. tot. Am Mesenterium mehrere verkäste Lymphknoten mit zahlreichen T.B. Mikroskopisch: Lunge normal, T.B. nicht gesehen. Leber keine

Gewebsveränderungen, aber die Mehrzahl der Kernkörperchen und Kerngerüststränge sind auffallend säurefest, leuchtend rot. Stellenweise scheinen auch Trümmer von T.B. und kleine T.B. selbst in Zellkernen zu liegen. Milz: Derselbe Befund wie in den Leberpräparaten. Hoden normal.

19) Frosch. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr. T.B. intraperitoneal.

4. Febr. tot. An der Infektionsstelle geringe peritonitische Adhäsionen. Leber geschwollen, gelblich gefleckt, Milz ebenfalls geschwollen, nirgends Knötchen. Mikroskopisch: Leber gleichmäßig durchsetzt von kleinen Häufchen größtenteils Körnerform zeigender, stets säurefester T.B., die überall innerhalb und in nächster Nähe der Pigmentzellen liegen. Milz ebenso von zahlreichen T.B.-Häufchen gleichmäßig durchsetzt.

20) Frosch. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal.

8. Febr. tot. Hochgradig abgemagert. Die makroskopische und mikroskopische Untersuchung ließen nichts Pathologisches erkennen, auch waren in Lunge, Leber, Niere, Milz, Ovarium T.B. nicht zu finden.

21) Frosch. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen. Dorsaler Lymphsack.

24. Jan. tot. Auf der Leberoberfläche zahlreiche weiße Pünktchen, Lungen normal aussehend. Mikroskopisch: Leber: Mäßig zahlreiche, schwach rot gefärbte T.B., dagegen zahlreiche rote Kernkörperchen und Kerngerüststränge. Nieren: Ganz vereinzelte T.B. gesehen, meist intrakanalikulär, dagegen massenhafte rot gebliebene Kerne resp. Kernkörperchen.

22) Frosch. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr. T.B. Dorsaler Lymphsack.

10. Febr. tot. Im dorsalen Lymphsack reichliches neugebildetes sulziges (Gewebe mit kleinen Knötchen, außerdem hier mehrere Kubikcentimeter eines hämorrhagischen Exsudates, das sehr zahlreiche, vielfach körnige, kleine T.B. enthält, die meist frei (extracellulär), zum Teil aber auch innerhalb von Rundzellen liegen. Geringes hämorrhagisches Peritonealexsudat. Leber und Milz geschwollen, zahlreiche Pünktchen. Mikroskopisch: Leber ganz und gar durchsetzt von enormen T.B.-Massen, die meist in Haufen innerhalb großer Zellen liegen; sie zeigen zum Teil Körnchenform, zum Teil sind es auch verzweigte Fäden, zum Teil sind sie nur noch ganz schwach rot gefärbt, viele endlich haben die Säurefestigkeit ganz eingebüßt und sind blau gefärbt. Auch in größeren Blutgefäßen findet man, in Leukocyten eingeschlossen, zahlreiche T.B. Stellenweise liegen offenbar in den Leberzellenkernen T.B. und andere leuchtend rote Einschlüsse. Auch die Kernkörperchen zeigen häufig die bereits oft erwähnte Säurefestigkeit. Auch die Lunge enthält zahlreiche große ein- und mehrkernige Zellen, die mit T.B. vollgestopft sind. Auch in Milz und Nieren liegen die sehr zahlreichen T.B. meist in Haufen innerhalb großer Zellen. Das sulzige Granulationsgewebe des Lymphsackes besteht ausschließlich aus Lymphzellen, die mit T.B. und säurefesten Kerneinschlüssen vollgestopft sind.

23) Frosch. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr. T.B. Dorsaler Lymphsack.

8. Febr. tot. Der Rückenlymphsack enthält wieder ein sulziges, hämorrhagisch infiltriertes Gewebe mit einzelnen gelblichen Knötchen, die mikroskopisch unzählige T.B. aufweisen. Geringe hämorrhagische Peritonitis, Schwellung der Abdominalorgane. Mikroskopisch: Leber zeigt eine enorme Vermehrung der T.B., das ganze Organ ist von Bacillenhaufen durchsetzt, auch in einem großen Ast der Leberarterie sind massenhafte T.B. nachweisbar. Milz und Lunge zeigen keinerlei Gewebsveränderung, aber sind ebenfalls von dichten T.B.-Haufen gleichmäßig durchsetzt. Nieren: Im interstitiellen und parenchymatösen Gewebe sehr zahlreiche T.B.-Haufen, besonders reichliche Bacillen in den Glomeruli. Hoden: Im interstitiellen Gewebe viele T.B.-Häufchen, bisweilen, aber viel seltener, auch in den Hodenkanälchen.

24) Frosch. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen. Hauttasche.

17. Jan. tot. An der Infektionsstelle, über der die genähte Haut gut verheilt ist, ein sulziges, gelbliches hämorrhagisch infiltriertes Gewebe mit mehreren käsigen Knötchen. Leber zeigt weiße Pünktchen; sonst innere Organe makroskopisch, ohne Veränderung. In Abstrichpräparaten der Leber sehr zahlreiche T.B. An Schnitten durch Haut- und Unterhautgewebe sieht man, daß die Epidermis vollkommen verheilt ist, im Unterhautgewebe an der Impfstelle einige konfluierende, nur noch schwach färbare käsige Knötchen, die außer reichlichen, oft auch lang ausgewachsenen, verzweigten, geschlängelten, körnigen T.B. auch Strahlenherde mit säurefesten Keulen enthalten; letztere liegen innerhalb zirkumskript verkäster Bezirke (vergl. vorige Arbeit). Die Knötchen entsprechen in Form und Größe etwa den Tuberkeln der großen Seewasserschilddrüse, von der die Reinkulturen stammen. Ovarium und Nieren ohne T.B. und ohne histologische Veränderungen.

25) Frosch. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen. Hauttasche.

17. Jan. tot. An der Infektionsstelle ist von den implantierten Käseknötchen nichts mehr zu sehen. Auf der Leberoberfläche kleine grauweiße Pünktchen.

Lungen blaurot, in der rechten ein gut hirsekorngroßes weißes Knötchen. Mikroskopisch: In Leber, Milz spärliche T.B. Das Lungenknötchen besteht aus *Distomum*-Larven, enthält keine T.B., ebensowenig Herz, Nieren, Ovarium.

26) Frosch. 19. Jan. 1903. R.K. Schr.T.B. von einer Hauttasche am Rücken aus mit der Platinöse allseitig im dorsalen Lymphsack verteilt.

13. Febr. tot, nachdem sich in den letzten 2 Tagen tonische Krämpfe eingestellt hatten. An der Infektionsstelle ein mit reichlicher Gefäßentwicklung versehenes sulziges Granulationsgewebe, Leber zeigt Pünktchen. Mikroskopisch: Leber zeigt hellere, kernarme Bezirke, ist ganz und gar von dichten T.B.-Schwärmen durchsetzt. Milz: Gewebe anscheinend wenig verändert, nirgends Knötchenbildung, das ganze Organ ebenfalls von zahllosen T.B.-Nestern durchsetzt. Auch in den Nieren zahlreiche T.B.-Häufchen, wenn auch nicht in so großer Menge wie in Leber und Milz. Lungen ebenfalls voller Häufchen von T.B., aber ohne nennenswerte Gewebsveränderungen. Hoden: Spermatogenese in vollster Entwicklung. Bacillen nicht gesehen.

f) 2 Karpfen.

27) Karpfen. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal.

7. Jan. tot. Reichliches hämorrhagisch fibrinöses Exsudat in der Peritonealhöhle, auch auf Milz, Leber, Därmen fibrinöse Auflagerungen. Mikroskopisch: Nieren: Hochgradig interstitielle Infiltration mit kleinen Rundzellen, viele Harnkanälchen mit homogenisierten Blutylindern ausgegossen. Auf der Nierenoberfläche, nicht im Innern des Organes, einzelne, meist schon körnig zerfallene T.B. In der Milz, in den Peritonealschwarten, in der Leber und in der Darmwand kleine, sich blau tingierende Stäbchen, die vielleicht, aber in diesem Falle nicht sicher, als entfärbte T.B. anzusprechen sind.

28) Karpfen. 19. Jan. 1903. R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal. Bereits am nächsten Tage tot. Außer einem geringen hämorrhagischen Peritonealexsudat und einigen Adhäsionen normaler Befund.

B. Warmblüter.

g) 3 Hühner.

29) Huhn. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal.

8. März bei bestem Wohlsin getötet. In der Leber einige kleine Knötchen, die T.B. enthalten, sonst innere Organe normal aussehend, auch bei mikroskopischer Untersuchung. In der Milz fallen viele Zellen auf, die säurefeste Granula enthalten, sowie Kerne mit rotem Kernkörperchen und Kerngerüst.

30) Huhn. 8. März 1903. Schkr.T.B. intraperitoneal.

3. April plötzlich tot, nachdem es bis zuletzt sehr gierig gefressen hat. Fibrinöse, stellenweise adhäsive Peritonitis, käsig peritoneale Schwarten, namentlich am Netz, auch auf der Leberoberfläche fibrinös-käsig Beschläge, sowie ganz vereinzelte Knötchen, die T.B. enthalten. In der Lunge werden bei mikroskopischer Untersuchung keine T.B. gefunden, dagegen finden sich in den verkäsenden Netzabschnitten sehr große, meistens durch fibröses Bindegewebe sich abkapselnde Herde, in denen enorme Massen leuchtend roter T.B. liegen, die in Form und Lagerung den Vogeltuberkelbacillen gleichen. Gerade die in diesem Falle mit den Schkr.T.B. erzeugten Netzherde sind mikroskopisch nicht zu unterscheiden von ebenfalls verkäsenden Netzkonglomerattuberkeln einer an spontaner (Vogel-)Tuberkulose zu Grunde gegangenen Taube, die mir kürzlich (von Dr. Kalischer) aus dem Institut des Herrn Geheimrat Munk übergeben und von der Kulturen angelegt sind.

31) Huhn. 19. Jan. 1903. Schkr.T.B. intraperitoneal. Dieses Tier, das noch zu einem weiteren Versuche verwandt wurde, ist zur Zeit des Abschlusses dieser Arbeit noch am Leben.

h) 2 Tauben.

32) Taube. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 8. März bei bestem Wohlsin getötet. Alle Organe sehen makroskopisch vollkommen normal aus.

33) Taube. 8. März 1903. Schkr.T.B. intraperitoneal. Auch dieses Tier ist zur Zeit noch am Leben und im Versuch.

i) 1 Hund.

34) Hund. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal und Hauttasche (linkes Hinterbein).

Die genähte Hauttaschenwunde verheilt glatt, in der Tiefe geringe Infiltration die später verschwindet, auch geringe Leistendrüsen Schwellungen gehen bald zurück.

8. März bei bestem Wohlsin getötet. Unter der Hautnarbe wenig sulzig ödematös durchtränktes Granulationsgewebe. Die inneren Organe zeigen keine Spur einer Veränderung. Mikroskopisch: In dem subkutanen Gewebe an der Impfstelle finden sich nekrotische Herde und in diesen homogene säurefeste Massen (eingeschmolzene T.B.-

Nester). Nach längerem Suchen wurden hier ganz vereinzelt blaßrote lange körnige T.B. gefunden. Die inneren Organe zeigen normale Beschaffenheit und enthalten keine T.B.

k) 2 Ratten.

35) Ratte. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal.

15. März tot. In den Lungen zahlreiche Herdchen, die wie käsig aussehen. Milz und Leber geschwollen, sonst ohne Veränderung. Auch bei der mikroskopischen Untersuchung erscheinen die Lungenherde wie verkäsende Tuberkel, doch wurde kein einziger T.B. gefunden. Die übrigen Organe von normalem Aussehen, enthalten keine T.B.

36) Ratte. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal.

28. Febr. bei bestem Wohlbefinden getötet. Makroskopisch: außer einer kleinen weißen Fleckung auf der Leber, sehen alle Organe normal aus. Mikroskopisch: Niere normal, Lunge kleine bronchopneumonische Herdchen, aber keine T.B. gefunden, Milz und Mesenterialdrüsen normal, ohne T.B. Leber: Gewebe ohne Veränderung, keine T.B. gefunden, nur ist bemerkenswert, daß die Leberzellenbalken trotz starker Entfärbung stellenweise ganz rot geblieben sind.

l) 3 weiße Mäuse.

37) Maus. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen. Hauttasche an der Schwanzwurzel.

10. Jan. tot. Die Hautwunde ist nicht verheilt, sondern ulceriert. Im subkutanen Gewebe ein käsiger Herd, in welchem sich zahlreiche T.B., größtenteils Körnchenfäden, finden. Jedoch sind die T.B. hier nur zum Teil säurefest und auch dann nur sehr matt rot gefärbt, vielfach zeigen sie eine metachromatische (blaue) Färbung. Lunge, Niere, Leber zeigen auch mikroskopisch keine Veränderungen und keine T.B.; dagegen finden sich sowohl in der — nicht vermehrten — Peritonealflüssigkeit als auch in einem kleinen schmierigen, Eiter entleerenden Absceß am Halse zahlreiche homogene, sowie körnige Bacillen, die genau wie T.B. aussehen, aber nicht säurefest, sondern metachromatisch blau gefärbt sind.

38) Maus. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 8. April tot. Alle Organe sind bei makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung vollkommen normal und frei von T.B.

39) Maus. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen subkutan. 28. Febr. gesund getötet. Alle Organe normal, frei von T.B.

m) 1 Kaninchen.

40) Kaninchen. 3. Jan. 1903. Lungenknötchen subkutan.

24. April bei gutem Wohlbefinden getötet. Innere Organe sehen vollkommen normal aus, nur finden sich in der Leber einige kleine weiße, strahlige Narben. An der Infektionsstelle ein in dem lockeren Unterhautgewebe liegender, sehr verschieblicher, etwa erbsengroßer Knoten, der im Innern käsig geschmolzen und nach außen durch eine derbe fibröse Kapsel abgegrenzt ist. Dieser Knoten war einige Zeit nach der Infektion fühlbar geworden, war anfangs größer geworden, dann aber auffallend schnell verkleinert, und wäre wohl ganz verschwunden, wenn das Tier länger am Leben gelassen worden wäre. Derselbe besteht bei mikroskopischer Untersuchung aus einem aus gleichmäßigen Rundzellen zusammengesetzten Granulationsgewebe mit vielen säurefesten Kernkörperchen und Gerüststrängen. Dagegen werden erst, nachdem eine größere Anzahl von Serienschnitten vergeblich durchforscht war, in dem käsig geschmolzenen Zentrum vereinzelt körnige T.B. gefunden. Alle inneren Organe erweisen sich gesund; in der Leber mehrere, aus Coccidien bestehende Knoten, nirgends eine Spur von Tuberkeln oder Tuberkelbacillen.

n) 10 Meerschweinchen.

41) Meerschweinchen. 8. März 1903. Gelatine-R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal. Große Dosis.

Tot 12. März unter Intoxikationserscheinungen. Im Peritonealraume freie, käsige Klümpchen, eines der Milz adhärierend. Im Netz beginnende Knötchenbildung, in der Milz Follikel geschwollen, Leber und Lunge makroskopisch normal aussehend. Mikroskopisch: Im Netz zahlreiche Knötchen mit großen, runden Zellen, die mit Häufchen winzig kleiner, meist zu noch kleineren Körnern zerfallender T.B. dicht vollgestopft sind¹⁾ (vgl. Fig. 8, die dem Peritoneum der Blind-

1) Rob. Koch fand ebenfalls „bei Meerschweinchen, welchen größere Mengen von Tuberkelbacillen in die Bauchhöhle injiziert wurden und welche schon im Laufe der ersten Woche starben, im Peritoneum reichlich T.B. enthaltende Leukocyten.

Einen dem meinigen ganz analogen Befund beschreibt neuerdings Römer bei Mäusen, die er mit großen Dosen (0,01 g) Perlsuchtbacillen intraperitoneal infiziert hatte und die in der Regel ebenfalls nach 4 Tagen zu Grunde gingen: „am Netz und an zahlreichen anderen Stellen des Bauchfells fanden sich schon mit bloßem Auge er-

schleiche entstammt). Stellenweise sind diese säurefesten Körnchen gar nicht mehr zu mehreren aneinandergereiht, sondern regellos in Massen in diesen Zellen verstreut; letztere scheinen so durch Phagocytose resp. Auflösung die Bacillen zu bewältigen. Eigentliche Riesenzellenbildungen sind noch nirgends zu konstatieren. Die Zellen besitzen durchweg gute färbbare Kerne. Milz, Lunge und Leber zeigen weder Bacillen noch histologische Veränderungen, nur fällt auf, daß auf allen Präparaten ein Teil der Leberzellenbalken trotz Entfärbung schwach rot geblieben ist.

42) Meerschweinchen. 8. März 1903. Bouillon-R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal. Sehr große Dosis.

Tot 16. März unter Intoxikationserscheinungen. Netz aufgerollt, voller konfluierender käsiger Knoten, sonst sehen die inneren Organe makroskopisch, abgesehen von einer mäßigen Hyperämie, normal aus. Mikroskopisch: Netz besteht aus einem meist aus lymphoiden Zellen bestehenden den Granulationsgewebe, das enorme Massen von T.B. enthält; letztere liegen wieder fast ausschließlich innerhalb großer Rundzellen und gehen hier offenbar zu Grunde (durch Auflösung). Die Milz zeigt keine histologischen Veränderungen, enthält aber hier und da Häufchen von kleinen, körnigen T.B.

43) Meerschweinchen. 8. März 1903. Gelatine-R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal. Sehr große Dosis.

Tot 16. März unter Intoxikationserscheinungen. An der Impfstelle ein größerer, mit den Därmen verbackener, käsiger Herd, Netz, wie im vorigen Falle, mit zahllosen käsigen Knoten, dagegen erscheinen Milz, Leber, Lungen, Nieren makroskopisch ganz normal.

Mikroskopisch: Netz: größtenteils diffuses Granulationsgewebe, welches kolossale T.B.-Massen enthält, die wiederum größtenteils intracellulär zu Grunde zu gehen scheinen. Rob. Koch selbst konstatierte bei Katzen, Meerschweinchen etc., die wenige Tage nach der Infektion starben: „Die Infiltration des Netzes bestand aus dichten, größtenteils in Zellen eingebetteten Massen von Tuberkelbacillen“. Außerdem finden sich lymphoide Knötchen mit großen Rundzellen, welche zum Teil ganz blaßrote, schemenhafte, in Auflösung begriffene T.B. enthalten; außerdem finden sich in ihnen Zellen, die mit zwar noch gut färbbaren, aber stets in kleinste Körnchen zerfallenen T.B. vollgestopft sind. Stellenweise, namentlich da, wo große T.B.-Ansammlungen sind, finden sich kaum noch färbbare, in Verwesung begriffene Gewebsbezirke. Die Leber zeigt hier und da im interstitiellen Gewebe Häufchen kleiner Rundzellen, die T.B. enthalten, im übrigen keine histologischen Veränderungen; aber auch im gänzlich unveränderten Gewebe hin und wieder kleine Ansammlungen von T.B., die auch hier stets sehr kleine, oft nur noch ganz schwach rot färbbare, also offenbar ebenfalls vor dem Untergange stehende Formen darstellen. Milz: Gewebe normal, enthält ebenfalls hier und da kleine Häufchen körniger T.B. Nieren und Lungen: ganz normal, enthalten keine Bacillen.

44) Meerschweinchen. 4. Februar 1903. Agar-R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal. Sehr große Dosis.

1. März bei bestem Wohlbefinden getötet. Netz enthält einige kleine Knötchen und einen kleinerensgroßen, käsigen Absceß. Auf dem Peritoneum vereinzelte (4 oder 5 gesehen) grauweiße Knötchen. Mesenterialdrüsen bis Bohnengröße, geschwollen, Leisten- drüsen apfelkerngroß, Bronchialdrüsen erbsengroß. Leber von normaler Färbung, enthält einige weiße, runde, perlmutterähnlich glänzende Knötchen¹⁾. Lungen überall luft- haltig, keine Knötchen. Milz und Nieren etwas geschwollen, keine Knötchen.

Mikroskopisch: Netz: Zum Teil diffuses, mit Riesenzellen und Epitheloiden versehenes Granulationsgewebe; dieses enthält zahlreiche, sich in Körnchen auflösende und zerbröckelnde, aber noch leuchtend rot gefärbte T.B. Oft liegen neben einigen noch gut erhaltenen Bacillen große Massen solcher hoch- gradig degenerierter T.B. in Form feinsten roter Pünktchen regellos zusammen in einer Riesenzelle (vgl. Fig. 12). Außer diesen diffusen Wucherungen finden sich auch zirkumskripte Knötchen mit Epitheloiden, Riesenzellen und vereinzelten T.B., also echte Tuberkel. Uebrigens finden sich auch hier, wie dies

kennbare gelbliche Knötchen, welche mikroskopisch aus Leukocyten und unzähligen Tuberkelbacillen bestanden.“

1) Die durch Schkr.T.B. im Meerschweinchenkörper erzeugten Tuberkel unterscheiden sich meistens durch ihre rundliche Form und ihre weiße, etwas glänzende Färbung von den durch menschliche T.B. hervorgerufenen, mehr gelblichen, unregelmäßig fleckigen Knötchen. Die vergleichende mikroskopische Untersuchung gibt hierüber Aufschluß, indem die durch Schkr.T.B. zwar ebenso wie die durch menschliche T.B. hervorgerufenen Tuberkel bacillenhaltige Riesenzellen und Epitheloide, aber einen größeren Gehalt an polynukleären Leukocyten („Eiterzellen“) als diese aufweisen (vgl. Fig. 7).

R. Koch bereits in seinem großen Werk 1884 beschreibt und wie es sich bisher immer weiter bestätigt hat, „alle Uebergangsstufen zwischen einfachen epitheloiden Zellen mit einem Bacillus und den vollständig ausgebildeten vielkernigen und mit vielen Bacillen versehenen Riesenzellen“ (Fig. 9a—e). Aber sowohl diese umschriebenen Tuberkelknötchen als die diffus tuberkulösen erkrankten Gewebepartien sind alleseitig durch derbe Bindegewebszüge abgegrenzt. — Sehr viele untersuchte Mesenterialdrüsen zeigen keine Spur von Tuberkulose und keine T.B., ebensowenig die Bronchialdrüsen und Leistendrüsen. Die Leberknötchen, die nur in sehr spärlicher Zahl vorhanden und ebenfalls durch fibröses Gewebe begrenzt sind, bestehen teils aus gewöhnlichen einkernigen Rundzellen, teils aus polynukleären Leukocyten, stets enthalten sie Epitheloide und bisweilen auch Riesenzellen mit Häufchen kleiner T.B. Bis auf diese verschwindend wenigen Knötchen erwies sich das Lebergewebe auf sehr vielen untersuchten Schnitten aus den verschiedensten Gegenden des Organes ganz normal und frei von Bacillen. Auch Nieren, Milz, Lungen und Darmwand sowie die Lymphfollikel des Darmes zeigen keine Spur von Tuberkulose und keinen einzigen T.B.

45) Meerschweinchen. 4. Februar 1903. Agar-R.K. Schr.T.B. intraperitoneal. Enorme Dosis (5 ccm einer konzentrierten Emulsion). 8. März getötet. Netz zusammengerollt, keine Knötchen. Leber durchsetzt von zahlreichen runden, weißen, glänzenden Knötchen, Mesenterialdrüsen wenig geschwollen, zum Teil gelblich verfärbt. Milz mit ihrer Unterlage fest verwachsen, an ihrem unteren Pole weißliche Fleckung, zeigt aber keine Knötchen, Lungen normal, überall lufthaltig, Nieren ebenfalls normal.

Mikroskopisch: Die Leberknötchen bestehen wiederum aus Rundzellen und polynukleären Leukocyten, enthalten auch stets Riesenzellen, die von den typischen tuberkulösen nicht zu unterscheiden sind und Häufchen sehr kleiner T.B.¹⁾ enthalten. Die meisten dieser Tuberkel sind bereits in Verkäsung begriffen: in diesem Stadium sind die Zellkerne nur noch schwach färbbar und vielfach mißstaltet und die T.B. nicht sehr zahlreich. Die jüngeren Tuberkel, die mit noch gut tingierbaren Kernen versehen sind, enthalten bedeutend mehr, oft große Mengen T.B., so daß also diese letzteren in den Knötchen zu Grunde gehen. Im unveränderten Lebergewebe — außerhalb der Knötchen — wurden niemals T.B. gesehen. Die Bacillen zeigen sowohl homogene als auch, vorzugsweise, körnige Formen und finden sich größtenteils intracellulär. Milz: Viele Zellen enthalten rotgefärbte Granula, doch wurden sonstige Veränderungen oder T.B. nicht gesehen. Lungen und Nieren ohne histologische Veränderungen und frei von T.B.

46) Meerschweinchen. 19. Januar 1903. Gelatine-R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal.

20. Februar tot. Netz zusammengerollt, mit mehreren gelblichen Knötchen. Alle Mesenterialdrüsen geschwollen von Apfelkern- bis Erbsengröße. Leber zeigt auf der Oberfläche und auf dem Durchschnitt einige der in den vorigen Fällen beschriebenen weißen Knötchen, Milz mit fibrinösen Schwarten, der Leibeswand fest angewachsen, Lungen außer geringen Hypostasen tadellos, lufthaltig, ohne Knötchen, Bronchialdrüsen wenig geschwollen, ebenso Inguinaldrüsen. Nieren normal.

Mikroskopisch: Die Netzknotchen zeigen kleine, meist nur schwach färbbare Zellkerne, keine Riesenzellen, und enthalten in kleinen Häufchen beieinander liegende, winzig kleine, meist körnig zerfallene T.B. Die Knötchen sind von derbem fibrösen Gewebe umschlossen; außerhalb des Tuberkels findet sich nicht ein Bacillus; das umliegende lymphoide Gewebe ist meist normal, bacillenfrei. Doch enthält es bisweilen Riesenzellen, die den tuberkulösen zwar ähnlich sind, aber an dieser Stelle nie einen T.B. enthalten. Lebergewebe, abgesehen von den erwähnten vereinzelt Knötchen, ganz normal und bacillenfrei. Ebenso ergibt die mikroskopische Untersuchung zahlreicher Schnitte durch Milz, Lungen, Nieren, Nebennieren, Hoden, Darm, Mesenterialdrüsen und Bronchialdrüsen keinerlei histologische Veränderungen und keine T.B.

47) Meerschweinchen. 8. März 1903. Agar-R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal.

1) Die Schkr.T.B. erscheinen im Meerschweinchenkörper schon nach einem Aufenthalte von nur wenigen Tagen als winzig kleine Stäbchen (Fig. 7, 9, 12) viel kleiner als menschliche T.B. im Säugetier- oder menschlichen Körper (Fig. 10 Riesenzelle aus einem Gaumenmandeltuberkel eines Kindes) resp. Schkr.T.B. im Schildkrötenkörper (Fig. 11 pigmenthaltige Riesenzelle aus der tuberkulösen Schildkrötenlunge). Offenbar ist für die Größe, zu der der Bacillus in dem jeweiligen Wirtkörper auswächst, von Einfluß, ob er in diesem von vornherein geeignete oder weniger geeignete Ernährung findet.

23. April getötet. Lungen, Milz, Nieren vollkommen normal, in der Leber, die vollkommen gesund aussieht, zwei ganz kleine, weiße Knötchen (wie sie in den vorigen Fällen beschrieben) in der Gegend der Gallenblase. Im Netz einige sehr kleine, weißgraue Knötchen und ein harter, kleinerbsengroßer, gelbgrauer Knoten, offenbar in Heilung und im Verschwinden begriffene Residuen der tuberkulösen Infektion. Mikroskopisch zeigen die affizierten Netzpartien teils einzelne fibrös abgegrenzte, teils konfluierende Knötchen mit Riesenzellen und Haufen von T.B. (vgl. Fig. 7). Da, wo die Bacillen nicht mehr vorhanden sind, sieht man fast ausnahmslos in allen Zellkernen säurefeste (rote) Kernkörperchen und Kerngerüststränge. Oft sieht man auch dichte Haufen winzig kleiner T.B. innerhalb enorm großer Riesenzellen, und zwar kann man bisweilen sehr schön verfolgen, wie sich um solche großen Bacillenhaufen herum Riesenzellen nach Art der Fremdkörperriesenzellen gebildet haben. Viele kleinere Riesenzellen, die in Größe, Form und Kernanordnung vollkommen den gewöhnlichen tuberkulösen Riesenzellen gleichen, enthalten einzelne winzig kleine T.B. und Bruchstücke solcher. Im übrigen bestehen die Tuberkel größtenteils aus polynukleären Leukocyten, die oft, aber durchaus nicht immer, T.B. enthalten. Leber: Die Mehrzahl der Zellkerne enthält säurefeste Einschlüsse, im übrigen keine Veränderungen, keine T.B. Milz: Keine histologischen Veränderungen, keine T.B.

48) Meerschweinchen. 3. Januar 1903. Lungenknötchen intraperitoneal. 4. Februar bei bestem Wohlbefinden getötet. Makroskopisch und mikroskopisch alle Organe normal, keine T.B. gefunden.

49) Meerschweinchen. 8. März 1903. Agar-R.K. Schkr.T.B. intraperitoneal. 12. Mai bei bestem Wohlbefinden getötet. Makroskopisch und mikroskopisch alle Organe vollständig gesund, nirgends eine Spur eines tuberkulösen Herdes, kein T.B. gefunden.

50) Meerschweinchen. 8. März 1903. Gelatine-R.K. Schkr.T.B. intrapulmonal (rechte Lunge).

12. Mai bei bestem Wohlbefinden getötet. Rechte Lunge zeigt an der Injektionsstelle ganz zirkumskripte, adhäsive Pleuritis und an dieser Stelle ein einziges, durch die Pleura hindurchscheinendes, rundes, grauweißes Lungenknötchen (in Form und Farbe vollkommen den oben beschriebenen Leberknötchen gleichend). Bronchialdrüsen zu einem großen, bindegewbig umschlossenen Paket zusammengebacken. Beim Einschneiden entleert sich aus dem geschmolzenen Zentrum reichlich dickrahmiger Eiter, in dem T.B. nicht gefunden werden. Die übrigen Organe sind von normaler Beschaffenheit. Mikroskopisch: Der Lungentuberkel, der einzelne degenerierte (kleine, körnige) T.B. enthält, hat genau dieselbe Struktur wie die bei intraperitonealer Injektion mit den Schkr.T.B. erzeugten Lebertuberkel. Er ist von derbem Bindegewebe rings umschlossen. Die Bronchialdrüsen zeigen einfach den Charakter entzündlicher Infiltration mit purulenter Erweichung im Zentrum, keine Spur von Tuberkulose und keine T.B. Die übrigen Organe erweisen sich bei mikroskopischer Untersuchung als vollkommen gesund.

Anhang: Die Säurefestigkeit.

Es sei zum Schlusse dieses Kapitels noch einmal auf jenen eigentümlichen, bisher meines Wissens nicht beschriebenen Befund hingewiesen, der bereits oben in den betreffenden Tierprotokollen kurz verzeichnet wurde: Die Imbibition bestimmter Gewebsbestandteile mit säurefester, offenbar aus den Schkr.T.B. stammender Substanz. Sowohl bei fast allen untersuchten Kaltblütern (Schildkröten, Ringelnattern, Blindschleichen, Fröschen) als auch bei der Mehrzahl der zu Versuchen verwendeten Warmblüter (Huhn, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen) wurden derartige Beobachtungen verzeichnet; und zwar erwiesen sich entweder gewisse Kernbestandteile, Kernkörperchen, Stränge des Kerngerüsts distinkt (s. o. Schildkröte, Blindschleiche, Frosch, Kaninchen, Meerschweinchen) oder bestimmte Gewebsbezirke, namentlich Leberzellenbalken, diffus säurefest (s. o. Ringelnatter, Ratte, Meerschweinchen) oder endlich es fanden sich in Leukocyten Einschlüsse („Granulationen“ ähnlich den in meiner vorigen Arbeit in der spontan tuberkulösen Schildkrötenlunge beschriebenen), die die färberische Reaktion

der T.B. gaben (s. o. Schildkröte, Huhn). Daß dieses Rotbleiben bestimmter Zellen resp. Zellbestandteile nur ein Zufall ist, etwa auf mangelhafter Entfärbung beruht, ist ausgeschlossen, da auf Serienschnitten durch ein solches Organ immer nur dieselben Kerne resp. Gewebsterritorien sich säurefest erweisen, ferner, da von nicht infizierten Tieren stammende Kontrollpräparate niemals derartige Befunde zeigten.

Dagegen sprechen für die Annahme, daß die säurefeste Substanz direkt von Schkr.T.B. stammt, welche vorher an den genannten Stellen vorhanden waren, aber als solche zu Grunde gegangen sind resp. ihre säurefeste Substanz abgegeben haben, einmal die beim Frosch gemachte Beobachtung, daß kleine Schkr.T.B. in Zellkernen lagen, dann aber die besonders in der tuberkulösen Ringelnatterleber festgestellte Tatsache, daß man innerhalb solcher diffus rot geliebener Leberzellenbalken dichte T.B.-Ansammlungen antrifft und deren successive Homogenisierung und Einschmelzung verfolgen kann, sowie daß sich in diesem säurefesten Leberzellengewebe T.B.-Haufen finden, die ihre säurefeste Substanz verloren und demzufolge die blaue Gegenfarbe angenommen haben.

Daß man durch Extraktionsmittel die Tuberkelbacillen ihrer spezifischen Färbbarkeit berauben kann, hat Robert Koch schon vor langer Zeit nachgewiesen. Später hat dann auch Borrel den Tuberkelbacillen künstlich die Säure- und Alkoholfestigkeit genommen: Durch längeres Einwirken von warmem Xylol wurde den Tuberkelbacillen eine wachsartige Masse entzogen, welche säure- und alkoholfest war, während die behandelten Bacillen diese Eigenschaft eingebüßt hatten, wohl aber noch die Fähigkeit besaßen, Tuberkel zu erzeugen.

Daß in ganz jungen Reinkulturen der Schkr.T.B. einzeln, noch nicht säurefeste Bacillenindividuen vorkommen, ist bereits oben im III. Kapitel erwähnt. Bei meinen in letzter Zeit recht zahlreich vorgenommenen Züchtungen von Tuberkelbacillen aus den verschiedensten Tierkörpern, auch aus dem menschlichen Körper, habe ich diese Tatsache, die für die jungen menschlichen T.B. von Ehrlich und später von Klein und Marmorek schon festgestellt war, regelmäßig bestätigt gefunden.

Daß aber auch alte degenerierende Schkr.T.B. unter Umständen einen Verlust der Säurefestigkeit erleiden und eine deutliche Kontrastfärbung annehmen, habe ich sowohl in den ursprünglichen tuberkulösen Lungen der großen Seewasserschildkröten (vgl. meine vorige Arbeit) als auch bei den mit den Reinkulturen der Schkr.T.B. vorgenommenen Tierversuchen (vgl. oben die Protokolle) häufig beobachtet.

Es ist also die Säurefestigkeit keine den verschiedenen Arten von Tuberkelbacillen stets und in allen Entwicklungsstadien zukommende Eigenschaft.

Ich behalte mir vor, auf diesen Punkt, dessen weitreichende praktische Konsequenz auf der Hand liegt, demnächst ausführlicher einzugehen.

Zusammenfassung.

Der Schkr.T.B. findet im Körper sämtlicher untersuchter Kaltblüterspecies (mit Ausnahme der beiden Karpfen, die einer akuten Intoxikation erlagen) eine enorme Vermehrung und schnelle Verbreitung in allen Organen:

Schildkröten gehen in mehreren Wochen bis Monaten, ganz gleich, welcher Infektionsmodus gewählt wurde (intraperitoneal, intrapulmonal, Hauttasche), an Miliartuberkulose, mit Massen von T.B. im Blute, zu Grunde. Dabei zeigt sich bisweilen ein gesetzmäßiger Verlauf: So gehen die beiden Tiere 3 und 4, die gleichzeitig mit gleicher Dosis infiziert waren, auch am selben Tage ein.

Ebenfalls eine Miliartuberkulose mit erheblicher Vermehrung der eingeführten Schkr.T.B. entsteht bei Ringelnattern und Eidechsen; doch erliegt die letztere Species schon viel schneller der Infektion (nach 10 resp. 24 Tagen).

Auch die untersuchten Blindschleichen (mit Ausnahme eines Tieres von 6 untersuchten) zeigten eine Allgemeinverbreitung der Bacillen, welcher sie nach einem Zeitraume von 7—54 Tagen erliegen.

Auch Frösche, die die Infektion 14—36 Tage überstehen, zeigen eine erhebliche Vermehrung der Schkr.T.B. in ihrem Körper.

Anders verhält sich der Schkr.T.B. im Warmblüterkörper:

Vögel scheinen der Infektion zu widerstehen und bei dem oben angewandten (intraperitonealen) Infektionsmodus höchstens lokale heilungsfähige Erkrankungsherde zu bekommen; doch soll über diesen Punkt hier ein abschließendes Urteil noch nicht gefällt werden, weil mehrere Versuche mit einem von Römer (aus dem v. Behringschen Institute) für Vögel angegebenen Infektionsmodus zur Zeit noch im Gange sind.

Der Hund ist nach dem einen bisher vorliegenden Versuchsergebnisse offenbar immun.

Auch Ratten scheinen nicht empfänglich für die Infektion zu sein; denn die oben erwähnten Lungenherde dürfen, da T.B. in ihnen nicht gefunden wurden, nicht mit Sicherheit als ursprünglich durch Schkr.T.B. hervorgerufen angesehen werden.

Auch die weiße Maus scheint nach den bisherigen, allerdings noch nicht genügend zahlreichen Versuchen immun zu sein.

Beim Kaninchen bildet sich an der Infektionsstelle ein von vornherein begrenzt bleibender, verkäsender Herd, der allmählich ganz verschwindet und das Wohlbefinden des Tieres in keiner Weise beeinträchtigt.

Sehr interessant sind die Resultate der Meerschweinchenversuche:

a) Injiziert man intraperitoneal enorm große Dosen, so gehen die Tiere akut (vgl. Fall 41, 42, 43) in 4—8 Tagen zu Grunde; sie zeigen dann käsige-fibrinöse Massen im Peritonealraume, speziell im Netz, wo sich auch schon beginnende Knötchenbildung bemerkbar macht; meist sind die Schkr.T.B. dann auch bereits in die Leber und Milz verschleppt. Aber bereits bei diesen wenige Tage nach der Infektion gestorbenen Tieren zeigt sich, daß die direkt aus der Schildkrötenunde gezüchteten Schkr.T.B. im Meerschweinchenkörper eine nennenswerte Vermehrung nicht erfahren, vielmehr größtenteils intracellulär zu Grunde gehen.

b) Ueberleben die Tiere nach solcher sehr hohen Infektionsdosis nur wenige Tage länger (im ganzen 12—14 Tage), so ist bereits echte Tuberkelbildung zu konstatieren, wie aus einem einer späteren Versuchsreihe angehörenden Protokoll hervorgeht, das ich hier als erläuterndes Beispiel vorweg anführe: Es handelt sich um ein 595 g schweres Meerschweinchen, welches mit der kolossalen Dosis von 0,3 g Reinkultur der Schkr.T.B. intravenös infiziert, nach einem anfänglichen

leichten Fieber und darauffolgendem ständigen Temperaturabfall, am 12. Tage auf 380 g abgemagert, zu Grunde ging; alle inneren Organe enthielten reichlich Häufchen meist zu Körnchen zerfallener Schkr.T.B., in der Lunge waren aber auch bereits zahlreiche, aus Riesenzellen, Epitheloiden und polynukleären Leukocyten bestehende Tuberkel vorhanden, die Mengen von Schkr.T.B. enthielten.

c) Unter gewissen Umständen, auf die einzugehen ich mir für später vorbehalten muß, überleben die Meerschweinchen selbst die Applikation enorm großer Dosen von Schkr.T.B. dauernd, wie die Fälle 44 und 45 zeigen. Es bilden sich dann lokal (also bei intraperitonealer Infektion gewöhnlich in Netz und Leber) echte, mit bacillenhaltigen Riesenzellen versehene Tuberkel, die aber stets durch ihre bindegewebige Abkapselung die Tendenz zur Heilung und Nichtgeneralisierung im Körper beweisen.

d) Die Fälle 46—50 zeigen, daß, wenn die Infektionsdosis nicht zu enorm hoch gewählt wird, die durch die Schkr.-T.B. im Meerschweinchenkörper hervorgerufenen tuberkulösen Veränderungen stets abheilen und sogar völlig verschwinden. Meerschweinchen 46 ist 32 Tage nach der Infektion an einem interkurrenten Darmkatarrh, der zur selben Zeit auch mehrere nicht infizierte Tiere im selben Stalle hinraffte, zu Grunde gegangen; die Meerschweinchen 47, 48, 49, 50 sind 44, 32, 65, 65 Tage nach der Infektion bei bestem Wohlsein getötet worden: Es fanden sich bei den Tieren 46, 47, 50 harmlose abgekapselte und im Verschwinden begriffene Residuen der alten Infektion, außerhalb dieser abgegrenzten Herde nicht ein Bacillus; in den Fällen 48 und 49 vollends war keine Spur einer Erkrankung mehr zu konstatieren.

Der Bacillus der Schildkrötentuberkulose ist, wie zum Schluß nochmals betont werden soll, innerhalb außerordentlich weiter Temperaturgrenzen (ca. 0—43°) zu wachsen im stande.

Es sind seine bei 37° gewachsenen Kulturen von entsprechenden Kulturen der menschlichen Tuberkulose im Aussehen absolut nicht unterscheidbar.

Diese Besonderheit kommt außer dem Schkr.T.B. von allen bisher bekannten Tuberkelbacillenarten nur dem Bacillus der Rindertuberkulose (Perlsucht) regelmäßig zu.

Es spricht diese Tatsache zu Ungunsten derjenigen Gegner der R. Kochschen Dualitätslehre der Menschen- und Rindertuberkulose, die als ein Argument für die Arteinheit der Menschentuberkulose und der Perlsucht die Tatsache ins Treffen führen, daß die Kulturen der menschlichen Tuberkulose und der Perlsucht ununterscheidbar sind. Denn letztere Tatsache beweist angesichts der Feststellung, daß zwei ohne weiteres sicher nicht identische Tuberkelbacillenarten (menschliche und Schildkrötentuberkulose) in ihren Kulturen trotzdem nicht zu unterscheiden sind, nichts für die Identität der menschlichen Tuberkulose und der Perlsucht. Von diesem Gesichtspunkte aus betrachtet, bietet die Entdeckung des Schkr.T.B. und seiner kulturellen Eigenschaften eine Stütze für die R. Koch-Schützische Lehre.

Der Schkr.T.B. hat auch noch aus anderen Gründen zu dem Bacillus der menschlichen und dem der Rindertuberkulose enge Beziehungen; er steht nicht nur im Aussehen seiner Kulturen, sondern auch in seinem tierpathogenen Verhalten dem Bacillus der Menschen- und dem der Rindertuberkulose besonders nahe, viel näher als der Bacillus der Fisch-

Blindschleichen-, Frosch- und selbst der Vogeltuberkulose dem Kochschen Bacillus stehen.

Denn im Gegensatz zu all diesen ist der Schkr.T.B. im stande, im Körper des empfänglichen Säugetieres, speziell im Meerschweinchenkörper, in allen Fällen echte Riesenzellen- und bacillenhaltige Tuberkel zu erzeugen, die von den durch Säugetiertuberkelbacillen hervorgerufenen oft nicht zu unterscheiden sind.

Und ebenso wie der Perlsuchtbacillus beim Menschen an der Infektionsstelle und in den regionären Lymphdrüsen wohl einige Tuberkel erzeugt, die aber die ausgesprochene Tendenz zum Lokalbleiben und zur Heilung zeigen, wie andererseits — was aus dem offiziellen Berichte der Herren Geheimrat Robert Koch und Geheimrat Schütz an den Herrn Unterrichtsminister und den Herrn Landwirtschaftsminister vom 1. Juli 1901 hervorgeht und was ich auch aus mündlichen Mitteilungen der Herren Geheimrat Dönitz und Geheimrat Schütz weiß — mit Menschentuberkulose infizierte Rinder an der Infektionsstelle einen käsigen Herd und vielleicht auch eine Tuberkulose der regionären Lymphdrüsen bekommen, die aber, vorausgesetzt, daß nicht enorme Dosen angewandt werden, nicht weiter fortschreitet, sondern sich abgrenzt und später ganz verschwindet: so entsteht, wie oben ausführlich dargetan ist und wie ich es seither in einer großen Zahl neuer, quantitativ genau dosierter Säugetierversuche bestätigt gefunden habe, durch Einverleibung nicht allzu großer Dosen Schkr.T.B. im Körper der für die Tuberkulose empfänglichsten Species, des Meerschweinchens, ein zwar spezifisch tuberkulöser, aber regelmäßig lokalisiert bleibender und in Heilung übergehender Herd.

Ueber weitere wichtige Eigenschaften [des Schkr.T.B. werde ich demnächst berichten.

Literaturverzeichnis.

- Bataillon, Dubard et Terre, Un nouveau type de tuberculose. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1897.)
- Bataillon, Moeller und Terre, Ueber die Identität des Bacillus des Karpfens (Bataillon, Dubard, Terre) und des Bacillus der Blindschleiche (Moeller). (Zeitschr. f. Tub. u. Heilstättenwesen. III. 1902.)
- v. Behring, Beitr. z. experim. Therapie. Heft 5. Tuberkulose.
- Friedmann, F. F., Ueber die Bedeutung der Gaumentonsillen von jungen Kindern als Eingangspforte für die tuberkulöse Infektion. (Zieglers Beitr. 28. 1900.)
- , Experimentelle Studien über die Erbllichkeit der Tuberkulose. (Zeitschr. f. klin. Med. Bd. XLIII. 1901.)
- , Artikel „Tuberkelbacillen“. (Encyklopädie der mikroskop. Technik, hrsg. von Ehrlich, Weigert etc. 1902.)
- , Spontane Lungentuberkulose mit großer Kaverne bei einer Wasserschildkröte (*Chelone corticata*). (Deutsche med. Wochenschr. 1903. No. 2.)
- , Spontane Lungentuberkulose bei Schildkröten und die Stellung des Tuberkelbacillus im System. (Zeitschr. f. Tub. Bd. IV. 1903. No. 5.)
- , Der Schildkrötentuberkelbacillus, seine Züchtung, Biologie und Pathogenität. [Kurze Mitteil.] (Deutsche med. Wochenschr. 1903. No. 26.)
- Koch, Rob., Die Aetiologie der Tuberkulose. (Mitteil. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. II. 1884.)
- Koch, Rob. und Schütz, Menschliche Tuberkulose und Rindertuberkulose (Perlsucht). Bericht an den Minister der geistlichen, Unterrichts- und Medizinalangelegenheiten und den Minister für Landwirtschaft, Domänen und Forsten vom 1. Juli 1901. (Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilkunde. Bd. XXVIII. Heft 1 u. 2.)
- Moeller, Ueber dem Tuberkelbacillus verwandte Mikroorganismen. (Therap. Monatshefte. 1898.)
- Römer, Ueber Tuberkelbacillenstämme verschiedener Herkunft. [Habilitationsschrift.] Marburg 1903.

Erklärung der Figuren.

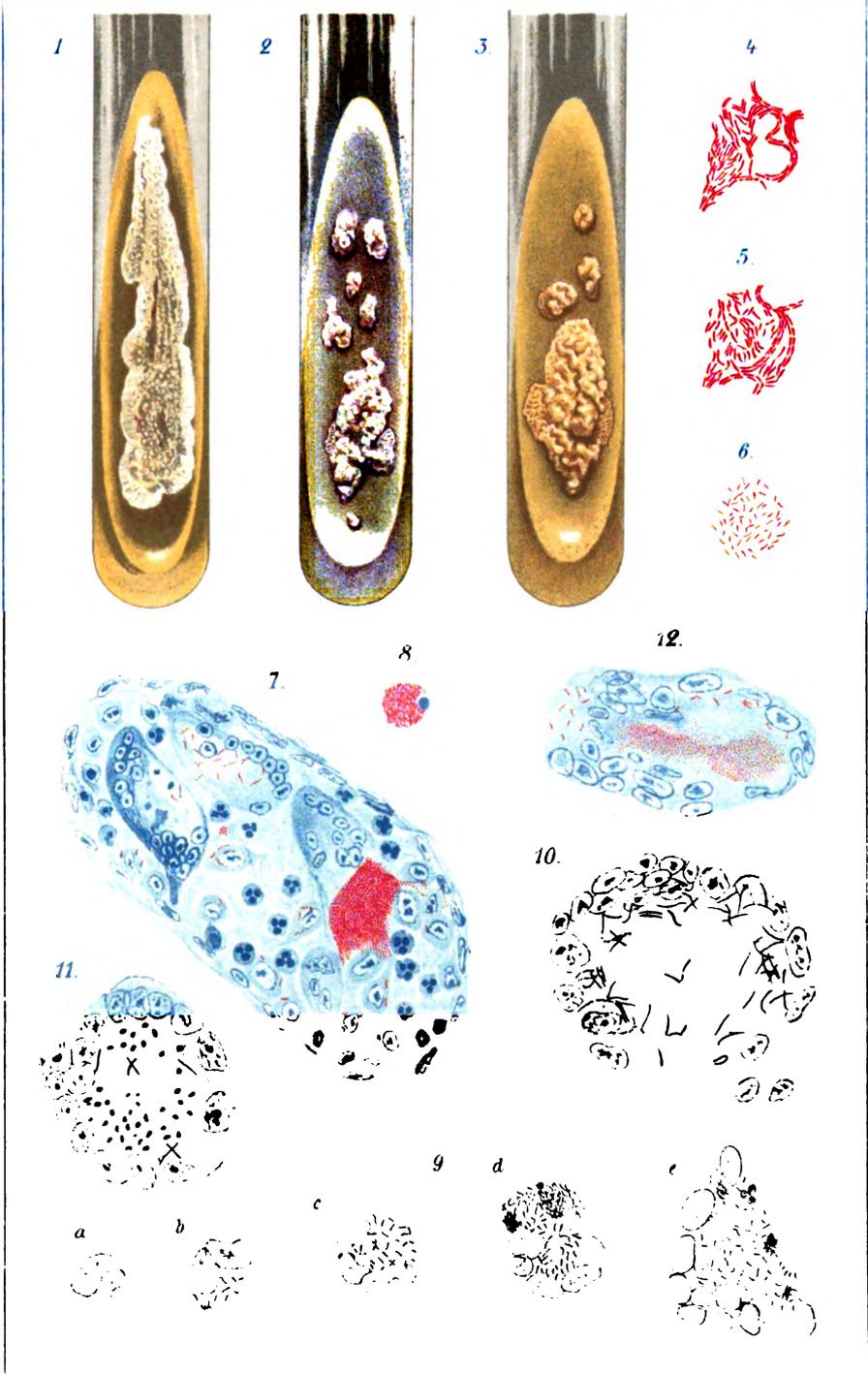
- Fig. 1 u. 2. Kulturen der Schildkrötentuberkulose, gewachsen bei 22° resp. 37°.
 Fig. 3. Kultur der menschlichen Tuberkulose.
 Fig. 4. Abstrichpräparat von einer Kultur der menschlichen Tuberkulose.
 Fig. 5 u. 6. Abstrichpräparate von Kulturen der Schildkrötentuberkulose, gewachsen bei 37° resp. 22°.
 Fig. 7. Fibrös abgegrenztes Knötchen mit Riesenzellen, Epitheloiden, polynukl. Leukocyten und zahlreichen Schkr.T.B. aus dem Meerschweinchenkörper, hervorgerufen durch Schkr.T.B.
 Fig. 8. Mit winzig kleinen, zu Körnchen zerfallenden Schkr.T.B. vollgestopfter Leukocyt aus dem Peritoneum der Blindschleiche.
 Fig. 9a—e. Uebergangsformen von einfachen epitheloiden Zellen mit wenigen Bacillen bis zu vielkernigen bacillenreichen Riesenzellen; aus dem Netz eines mit Schkr.T.B. infizierten Meerschweinchens.
 Fig. 10. Riesenzelle aus einem Gaumenmandeltuberkel eines kleinen Kindes.
 Fig. 11. Pigmenthaltige Riesenzelle aus der spontan tuberkulösen Schildkrötenschlange.
 Fig. 12. Riesenzelle aus einem mit Schkr.T.B. erzeugten Netztuberkel des Meerschweinchens.
 Fig. 10, 11, 12 sind bei gleicher Vergrößerung (Zeiss Apochrom. Immers. 2,0; Kompens. Okul. 6) gezeichnet.
 Fig. 1—3 sind vom Maler M. Landsberg, Fig. 4—12 mit Zuhilfenahme des Zeiss'schen Zeichenapparates vom Verf. hergestellt.

*Nachdruck verboten.***Die Trypanosomen in der Menschen- und Tierpathologie, sowie vergleichende Trypanosomenuntersuchungen.**Von **Lydia Rabinowitsch** und **W. Kempner**.

Mit 1 Tafel.

Die Erforschung der durch Trypanosomen hervorgerufenen Tierseuchen in den heißen Ländern hat in dem letzten Jahrzehnt in ätiologischer Beziehung bedeutende Fortschritte gemacht, wenn auch in prophylaktischer und therapeutischer Hinsicht bisher nur geringe Erfolge zu verzeichnen waren. Ueber die in Indien herrschende Surra, welche Pferde, Maulesel, Hunde, Rinder, Kamele, Büffel und andere Tiere befällt, hat *Lingard* (4, 8) ausführliche Berichte gegeben, denen sich Mitteilungen von *Rogers* (40) aus Indien, von *Penning* (9, 23), *Vrijburg* (24, 65), *de Does* (32) aus Niederländisch-Indien und *v. Carougeau* (31) aus Indo-China anreihen. Das Vorkommen der Surra wurde neuerdings auch auf den Philippinen (47—49) und der Insel Mauritius (79) festgestellt. Die Kenntnis der dieselben Tierspecies befallenden und dem klinischen Bilde nach mit der Surra identischen *Nagana* oder *Tsetse*-Krankheit in Afrika verdanken wir vor allem *Bruce*, welcher dieselbe im Zululand studiert und ein vollständiges Bild über die Aetiologie und Pathologie derselben gegeben hat. *R. Koch* (1, 41) lenkte später durch eingehende Untersuchungen in Ostafrika, welche besonders auf die Bekämpfung der Tsetsekrankheit hinzielten, von neuem die Aufmerksamkeit auf die durch Trypanosomen bedingten Tierseuchen. *Schilling* (42, 66, 101) und *Ziemann* (74, 109—110) haben die *Nagana* in Westafrika studiert und setzen ihre Arbeiten daselbst weiter fort.

Als dritte Trypanosomenkrankheit wäre die *Dourine*, Beschälseuche der Pferde, in Algier zu nennen, für die *Schneider* und



Buffard (11—16) die bereits vorher von Chauvrat und Rouget gefundenen Trypanosomen verantwortlich machen.

Ferner wurden neuerdings Trypanosomen als Erreger der in Südamerika seit Jahren bekannten Pferdekrankheit *Mal de Caderas* von Elmassian (34, 70, 118) in Paraguay beschrieben; weitere Untersuchungen von Zabala (36), Voges (35, 71) und ganz besonders Lignières (73, 130, 131) in Argentinien haben die Aetiologie des *Mal de Caderas* bestätigt.

Eine weitere pathogene Trypanosomenart hat Theiler (54) im vorigen Jahre bei Rindern in Transvaal beschrieben, die aber sicherlich nicht mit den oben genannten Trypanosomenarten identisch ist.

Aber nicht nur in den Ländern, in denen diese Seuchen heimisch sind, in Asien, Afrika und Amerika, sondern auch in Europa hat man dem Studium der Trypanosomenkrankheiten in den letzten Jahren mit großem Eifer obgelegen, und vor allem waren es Nocard, Laveran und Mesnil in Paris, welche die Kenntnis sämtlicher obengenannten Trypanosomen in ätiologischer und pathologischer sowie biologischer Beziehung in hohem Maße durch eine große Reihe wertvoller Beiträge gefördert haben. In England haben Kanthack, Durham und Blandford (2) sowie Plimmer und Bradford (7, 59) nicht unwichtige Untersuchungen über die Nagana angestellt.

Dieses wären die wichtigsten Arbeiten der letzten Jahre, welche die Trypanosomen als Erreger verheerender Tierseuchen in den Vordergrund der Protozoenforschung gestellt haben. Für die menschliche Pathologie hatten diese flagellaten Blutparasiten jedoch bisher kaum ein Interesse, obwohl Hehir und Barron (105) über zweifelhafte Fälle von Trypanosomenbefunden beim Menschen berichtet haben. Etwas sicherer lauteten die Angaben von Nepveu (3), welcher 1898 sieben Trypanosomenbefunde aus Algier mitteilte, von denen 6 Malariakranke betrafen. Da die Fälle bereits 7 Jahre früher untersucht wurden, und nur eine sehr ungenaue Beschreibung der Parasiten vorliegt, so ist auch diese Mitteilung nicht als einwandfreier Trypanosomenbefund beim Menschen anzusehen.

Der erste sichergestellte Fall wurde im Vorjahre von Forde (95) und Dutton (93, 94) in Gambia, Westafrika, bei einem Europäer beobachtet, der mit leichtem remittierendem Fieber erkrankt war und die Symptome großer Körperschwäche und Anämie darbot. Im frischen Blut sowie im gefärbten Präparat wurden wiederholt, aber nur während der Fieberstadien, Trypanosomen, allerdings in spärlicher Anzahl, nachgewiesen. Dutton hat die Parasiten genauer beschrieben und hält sie morphologisch dem Naganaparasiten für sehr ähnlich, Entwicklungsformen wurden nicht gefunden; Tierversuche fielen vorläufig negativ aus. Derselbe Kranke kehrte nach Liverpool zurück und wurde von Annet (103) in der Schule für Tropenmedizin bis zu seinem nach anderthalb Jahre erfolgten Tode weiter beobachtet; die Sektion unterblieb. Der Trypanosomenbefund wurde in den letzten Lebensmonaten immer spärlicher, jedoch bewies die Verimpfung auf weiße Ratten und Affen das Vorhandensein derselben im Blut. Die Tiere zeigten eine chronische, 2—3 Monate währende, letal verlaufende Krankheit, die Parasiten waren aber nicht immer mikroskopisch nachweisbar. Hunde verhielten sich refraktär; die Angaben über die Tierversuche sind im übrigen ziemlich kurz gehalten.

In seiner ersten Mitteilung erwähnt Dutton, daß er bei der Untersuchung von Kindern in Gambia auf Malaria bei einem anscheinend ge-

sunden Kinde von 3 Jahren neben einigen Malariaringen Trypanosomen gefunden habe, die den oben beschriebenen vollständig glichen. Diese Befunde veranlaßten die Liverpool School of Tropical Medicine eine Expedition nach Senegambien zur weiteren Erforschung der Trypanosomiasis zu senden (August 1902). Der kurze vorläufige Bericht von Dutton und Todd (103) über diese Expedition gibt fünf weitere Trypanosomenbefunde im Blut unter mehr als 300 untersuchten Individuen¹⁾, einen bei einem Weißen und vier bei Eingeborenen. Bis auf einen Fall, der keine besonderen Krankheitserscheinungen und trotzdem die meisten Parasiten, bis zu 23 in einem Präparat, zeigte, war bei den anderen vor allem unregelmäßiges Fieber, allgemeine Schwäche, zum Teil eine vergrößerte Milz vorhanden. Die Parasiten der verschiedenen Fälle glichen einander vollkommen; ihre Pathogenität für Tiere wurde noch nicht sicher festgestellt, soweit aus den kurzen Angaben ersichtlich ist. Die Autoren glauben, daß die Trypanosomen im zentrifugierten Blut sicherer und häufiger nachgewiesen werden könnten. Erwähnt möge noch werden, daß sich in einer Ortschaft bei 6 Pferden, die zum Teil keine besonderen Krankheitserscheinungen zeigten, zahlreiche Trypanosomen im Blut fanden. Im Tierexperiment schienen sich dieselben den Naganaparasiten nicht unähnlich zu verhalten, obwohl sie morphologisch angeblich Abweichungen zeigten.

Kurze Zeit hierauf, im März und Mai d. J., berichteten Manson (106), sowie Manson und Daniels (122) über zwei Trypanosomiasisfälle vom Kongo (Leopoldville und Monsambe), welche Europäerinnen betrafen und in London beobachtet wurden. Bei beiden sollen die von Erythem begleiteten remittierenden Fieber nach Insektenstichen am Bein aufgetreten sein. Manson spricht bei dem zweiten Fall neuerdings (107) die Vermutung aus, daß die Infektion durch innigen Kontakt mit einer gleichfalls an Trypanosomiasis leidenden Person erfolgt sei. Wiederum fanden sich die Trypanosomen vornehmlich während der Fieberzeit in mäßiger Anzahl im Blut. Chinin war auch in diesen Fällen ohne Einfluß auf den Fieverlauf, desgleichen Arsen, welches im Forde-Duttonschen Falle sehr günstige Wirkung gezeigt hatte. Der erste Mansonsche Patient kehrte nach Afrika zurück, während der zweite sich noch in Behandlung befindet. Bei letzterem sah Manson vor einem Fieberanfall zwei Entwicklungsformen (angeschwollene Trypanosomen mit doppelter Geißel) und nacher eine bedeutende Zunahme der Parasitenanzahl. Sämtliche Uebertragungsversuche auf Ratten, Mäuse, Hund, Affe, Pferd, Schwein etc. fielen negativ aus.

Vom Kongo liegen bisher noch einige ganz kurze Mitteilungen über Trypanosomenbefunde, anscheinend sämtlich bei Europäern, vor: 1 Fall von Le Moal (85) in Brazzaville, 1 Fall von Brumpt (115) in Boumba und 2 von Broeden (106) in Leopoldville. Leishman (123) spricht bei einem Fall von Dum-dum-Fieber in Indien nur die Vermutung aus, daß er in der Milz möglicherweise Entwicklungsformen von Trypanosomen gesehen habe. Dieselben Gebilde sah neuerdings auch Donovan (139) in Indien bei einigen Fällen in der Milz.

Aus diesen im letzten Jahre erhobenen Befunden ging trotz deren bisher noch geringer Anzahl jedenfalls die Tatsache hervor, daß die menschliche Pathologie in den Tropen mit einer bisher unbekanntem, von

1) Im ganzen hat Dutton nunmehr über 1000 Individuen in Senegambien untersucht und 7mal Trypanosomen im Blute gefunden. (Lancet. 1903. 22. August. p. 542.)

den Engländern als „Trypanosomiasis“ oder „Gambia fever“ bezeichneten Krankheitsform zu rechnen hat, als deren Erreger die im Blut gefundenen Trypanosomen angesehen werden müssen.

In rascher Folge hat nun die Trypanosomenforschung hinsichtlich der Aetiologie tropischer Krankheiten einen weiteren Fortschritt, und zwar wiederum von englischer Seite, erfahren. Anfang dieses Jahres erhielten wir aus London die Mitteilung, daß Castellani, der im Auftrage der Royal Society nach Uganda, Zentral-Afrika, zur Erforschung der Schlafkrankheit der Neger (sleeping sickness) entsandt war, Trypanosomen in der Cerebrospinalflüssigkeit der Kranken gefunden habe. Die Schlafkrankheit der Neger war bisher eine ebenso interessante wie dunkle Erkrankung. Sie herrscht epidemisch in verschiedenen Teilen Afrikas und befällt nur Neger. Ihr Hauptsymptom ist ein schlafsüchtiger Zustand, der sich schließlich bis zum tiefen Coma steigert. Der Verlauf ist chronisch, der fast unvermeidliche Tod erfolgt nach 3—12 Monaten. Der anatomische Befund ist, abgesehen von einer stets vorhandenen Hyperämie der Hirnhautgefäße, negativ. Die bisherigen bakteriologischen Befunde widersprachen sich; die Mansonsche Theorie, welche als Ursache der Schlafkrankheit *Filaria perstans* ansieht, war auch noch zweifelhaft. Ganz neuerdings erklärte Ziemann (97) die Schlafkrankheit für eine Intoxikation, bedingt durch den Genuß von rohem Maniok.

Kehren wir zu den interessanten Befunden Castellani zurück, über die nunmehr ausführlichere Berichte (119, 125—127) vorliegen. Castellani hatte bei der Untersuchung schlafkranker Neger, welche in Entebbe (Uganda) vorgenommen wurden, den glücklichen Einfall, die *intra vitam* durch Punktion gewonnene Cerebrospinalflüssigkeit (von ca. 15 ccm, von der die obersten blutig gefärbten 5 ccm abgegossen wurden, ca. 15 Minuten lang zu zentrifugieren und dann erst das Sediment mikroskopisch zu besichtigen. Auf diese Weise konnten in der Cerebrospinalflüssigkeit von 34 Kranken in 19 Fällen, gleich ca. 60 Proz., Trypanosomen aufgefunden werden. Dieser Befund wurde zweimal auch *post mortem* bestätigt, in denen sich die Parasiten auch in den Seitenventrikeln vorfanden. Eine Blutuntersuchung wurde nur in wenigen Fällen, einmal mit sicherem positiven Trypanosomenbefund vorgenommen. Sowohl in der Cerebrospinalflüssigkeit wie auch im Blut sah Castellani Gebilde, die er für Entwicklungsformen der genannten Blutparasiten ansieht. Zur Kontrolle untersuchte Castellani in Entebbe die Hirnrückenmarksflüssigkeit von 12 Negern, die nicht an der Schlafkrankheit litten, sondern anderweitige Erkrankungen, zum Teil mit leichten Fiebererscheinungen aufwiesen — sämtliche Fälle mit negativem Ergebnis. Hingegen fanden sich bei 3 Negern dieser Kontrollserie, welche Fiebererscheinungen, mit Kopfschmerzen, in einem Fall vergrößerte Milz zeigten, spärliche Trypanosomen während der Fieberanfälle im Blut. Malaria-parasiten waren in diesen Fällen, die ausführlich von Baker (124) beschrieben werden, nicht nachweisbar.

Wenn auch durch diesen zum erstenmal von Castellani erhobenen Trypanosomenbefund in der Cerebrospinalflüssigkeit schlafkranker Neger die Aetiologie und Pathogenese der bis dahin so rätselhaften Erkrankung noch nicht vollständig aufgeklärt erscheint, so glauben wir bei dem hohen Prozentsatz der positiven Befunde doch immerhin schon jetzt die Behauptung aufstellen zu dürfen, daß die Trypanosomen in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Schlafkrankheit stehen. Der zumeist *post mortem* von Castellani durch Kultur gesicherte

Streptokokkenbefund scheint doch nur eine sekundäre Bedeutung zu haben. Unsere obige Annahme erhält eine weitere gewichtige Stütze durch folgende Mitteilung Bruces (120), des Entdeckers der Nagana-Trypanosomen, an die Royal Society, welche denselben zur weiteren Erforschung der Schlafkrankheit nach Uganda entsandt hatte. In sämtlichen 38 untersuchten Fällen von Schlafkrankheit fand Bruce Trypanosomen in der Cerebrospinalflüssigkeit, in 12 von 13 diesbezüglich untersuchten Fällen auch im Blut¹⁾.

Kann somit die Castellanische Entdeckung als bestätigt angesehen werden, so erhebt sich nun vor allem die Frage nach der Art der Uebertragung der Krankheitserreger. Die Forschungen der letzten Jahre haben zur Genüge bewiesen, daß die Blutparasiten im allgemeinen durch Insekten übertragen werden. Dies dürfen wir wohl nach dem vorliegenden Material auch für die Trypanosomen annehmen. Für die nicht pathogenen Rattentrypanosomen haben wir den experimentellen Nachweis der Uebertragung durch Flöhe erbracht, und erfuhren eine Bestätigung durch Laveran und Mesnil. Mc Neal und Novy sahen hingegen lebende Trypanosomen im Magen der Rattenläuse (141). Als Verbreiterin der Naganatrypanosomen wird in allen von der Seuche heimgesuchten Gegenden die Tsetsefliege angenommen; Bruce hat diese Annahme durch das Experiment gestützt. Für die Surratrypanosomen gelten *Tabanus tropicus* und *Tabanus lineola* in Indien als Ueberträger, während Curry (63, 64) bei der Surra auf den Philippinen die Trypanosomen im Magen und Rüssel der gemeinen Stallfliege, *Stomoxys calcitrans*, aufgefunden hat. Der Uebertragungsmodus des Mal de Caderas ist nach Elmastian und Lignières (73) noch nicht völlig aufgeklärt, obwohl letzterer ebenfalls in den Leibern von *Stomoxys calcitrans*, die von kranken Tieren stammten, infektiöse Trypanosomen nachwies; Sivori und Lecler (100) haben sogar mit positivem Erfolg gesunde Pferde von diesen Fliegen stechen lassen. Hingegen sollen bei der Verbreitung der Dourine nach den Untersuchungen von Schneider und Buffard, sowie Nocard's (17) die Trypanosomen durch den Coitus übertragen werden. Unsere eigenen mit Dourinetrypanosomen angestellten Versuche zeigten jedoch, daß sich Ratten auch durch Vermittlung von Insekten, speziell Flöhen, infizieren lassen. Wir setzten sowohl männliche infizierte weiße Ratten mit männlichen nicht infizierten als auch infizierte Weibchen mit nicht infizierten zusammen, so daß eine Uebertragung durch den Begattungsakt ausgeschlossen war, und erhielten in beiden Reihen positive Resultate. Die Uebertragung der Parasiten durch Zusammensperren infizierter und nicht infizierter Ratten in einen Käfig gelang uns bei der Dourine nicht so häufig (30—40 Proz.) wie bei den Rattentrypanosomen (75—80 Proz.). Daß die Rattenflöhe in der Tat die Dourinetrypanosomen beherbergten, haben wir in ähnlicher Weise wie bei unsern früheren Versuchen mit *Trypanosoma Lewisi* festgestellt und auch durch den Befund von Trypanosomen im Flohmagen bestätigt. Eine einwandfreie Uebertragung durch den Coitus mit sicherem Ausschluß der Insekten als Vermittler der Dourinetrypanosomen war uns auch bei Kaninchen nicht möglich.

1) Die Castellanischen Befunde veranlaßten die portugiesische Expedition zur Erforschung der Schlafkrankheit (Annibal Bettencourt, Ayres Kopke, Gomes de Rezende ed Correia Mendes), ihre Präparate nachzuprüfen. In 4 von 12 Fällen ließen sich denn auch Trypanosomen im Blute auffinden, in der Cerebrospinalflüssigkeit, die jedoch nicht nach der Castellanischen Methode verarbeitet worden war, dagegen nicht (147).]

Ueber unsere Dourineversuche werden wir demnächst an anderer Stelle berichten.

Jedenfalls gaben uns aber dieselben zu bedenken, ob die sogenannte Beschälseuche s. Dourine in der Tat durch Trypanosomen hervorgerufen wird, oder falls dieses sich weiter bestätigen sollte — Symptome und Pathologie der Dourine zeigen ja eine weitgehende Uebereinstimmung mit Surra und Nagana — ob bei der Uebertragung der Parasiten neben dem Begattungsakt nicht auch noch blutsaugende Insekten eine Rolle spielen. Das in der Heimat der Dourine, in Algier, auch die Nagana zu Haus ist, zeigt uns eine neuere Mitteilung von Szewczyk (113). Nach de Does (33) kommt die durch Trypanosomen hervorgerufene Beschälseuche der Pferde auch auf Sumatra vor, woselbst die Surra endemisch ist. Ferner sprachen letzthin selbst Schneider und Buffard (98) die Vermutung aus, daß Rouget (111) seinerzeit wohl nicht mit Dourine-, sondern mit Naganamaterial gearbeitet habe. Es wäre also in diesen Gegenden die Annahme eines gleichzeitigen Auftretens der Beschälseuche und der Nagana resp. Surra bei einem und demselben Tiere nicht ganz von der Hand zu weisen. Aus diesen Notizen ersehen wir jedenfalls, daß die Akten über die Dourine noch nicht abgeschlossen sind.

Die Mehrzahl der Trypanosomenseuchen scheint, wie wir soeben erfahren haben, durch Stechfliegen ihre Verbreitung zu finden. Die Vermutung, daß diese oder andere Insekten auch bei dem menschlichen Trypanosomenfieber oder bei der durch Trypanosomen hervorgerufenen Schlafkrankheit als Zwischenwirte eine Rolle spielen, gewinnt durch ältere Angaben eine nicht unwichtige Stütze. So hat Livingstone und später Sir John Kirk u. a. die tick-disease in Portugiesisch-Südafrika im Zambesital beim Menschen beschrieben, während Daniels vom tick-fever in Britisch-Zentralafrika spricht; von letzterem ausgeführte Blutuntersuchungen fielen allerdings negativ aus. Manson (106) ist nicht abgeneigt, bei seinen oben geschilderten Trypanosomiasisfällen vom Kongo, die nach Insektenstichen auftraten, die von Livingstone beschuldigte giftige Zecke, *Argas moubata*, als Trägerin des Krankheitskeims anzusehen.

Auch in den anderen meistens an Seen und Flüssen beobachteten Fällen von Trypanosomiasis, die bisher verzeichnet sind, ist es sehr wahrscheinlich, daß Insekten die Blutparasiten übertragen haben; in allen diesen Gegenden ist besonders die Tsetsefliege zu Haus und die durch sie verbreitete Nagana. Für die Verbreitung der Schlafkrankheit scheint sogar diese Fliege, die *Glossina morsitans*, allein in Frage zu kommen. In einer der letzten Sitzungen der Société de Biologie erklärte dies Brumpt (128) für sehr wahrscheinlich. Ueberall da, wo die Tsetsefliege nicht vorkommt, vermag sich die Krankheit nicht auszubreiten. So wurden verschiedene Fälle von Schlafkrankheit nach den Antillen verschleppt, ohne daß die Krankheit dort festen Fuß fassen konnte. Unter den verschiedensten Insekten, welche daselbst den Menschen belästigen, fehlt die Tsetsefliege. Interessanter sind die weiteren Daten, die Brumpt gibt. Während in Banamia unter den am Kongo selbst lebenden 3000 Fischern die Schlafkrankheit entsetzlich wütete, so daß augenblicklich nur noch 300 von ihnen leben, sind die in der Nähe einer Trappistenmission lebenden Eingeborenen, welche selten zum Fluß hinunterkommen und ihr Trinkwasser aus Quellen beziehen, vollkommen von der Seuche verschont geblieben. Am Flusse selbst kommt die Tsetse-

fliege in großen Scharen vor, während in der 20 Minuten vom Flusse abgelegenen Mission keine Fliege zu treffen ist. Die Einwohner eines anderen Dorfes, die schrecklich zu leiden hatten und mitten in der von der Schlafkrankheit befallenen Gegend wohnten, sind vollkommen gesund, seitdem sie Ackerbau treiben und nicht mehr zum Fluß hinabkommen, wo sie von der Tsetsefliege gestochen werden könnten. Auch Sambon (129) spricht sich angesichts der Castellanischen Befunde für die Verbreitung der Schlafkrankheit speziell durch die Tsetsefliege aus.

Es ist aber nun eine weitere Frage zu beantworten, weshalb von der Schlafkrankheit im allgemeinen nur die Neger betroffen werden, obwohl vereinzelte Fälle auch unter Weißen zur Beobachtung kamen. Sollte etwa der Geruch der Eingeborenen auch die Tsetsefliege besonders anziehen, wie dies für Anopheles die Beobachtungen der englischen Malariaexpedition (25) ergeben haben? Wenn auch die bisherige Annahme, daß der Mensch, obwohl er im Laufe kürzester Frist wiederholentlich von der Tsetsefliege gestochen wird, ohne ernstere Störungen davonkommt, nach den mitgeteilten Tatsachen nicht mehr zu Recht bestehen kann, so müssen wir vorläufig mangels plausibler Gründe das Verschontbleiben der Weißen von der Schlafkrankheit für eine Rassenimmunität erklären. Das in klinischer Beziehung von der Schlafkrankheit vollständig differente und meistens unter leichteren Symptomen verlaufende Trypanosomenfieber befällt hingegen nicht nur Europäer, wie es nach den ersten Berichten schien, sondern auch Eingeborene. Nicht unerwähnt lassen wollen wir hier übrigens die von Laveran (58) aufgestellte Hypothese, daß der Mensch deshalb nicht von der Nagana befallen werde, weil das menschliche Blutserum nach seinen Versuchen einen schädigenden Einfluß auf die Naganatrypanosomen in unzweideutiger Weise ausübt. Nach neueren Versuchen Laverans (138) hat das menschliche Blutserum dieselbe Wirkung auch auf Surra- und Caderasparasiten. Diese Eigenschaft des menschlichen Blutserums können wir aber nicht als eine spezifische auffassen. Auf die Dourinetrypanosomen wirkte nach unseren Untersuchungen nicht nur das menschliche Blutserum mikrobizid, sondern in einigen Versuchen auch das Serum gegen *Trypanosoma Lewisi* aktiv immunisierter weißer und passiv immunisierter grauer Ratten.

Das Vorkommen von Trypanosomen beim Menschen in gewissen tropischen Distrikten dürfte nach alledem voraussichtlich ein nicht allzu seltenes sein, wenn wir uns vergegenwärtigen, daß bei dem bisherigen Untersuchungsmodus immer nur vereinzelte Parasiten, und zumeist nur während des Fieberanfalles, sichtbar wurden. Ferner wissen wir nach den Untersuchungen Bruces, daß anscheinend gesunde Tiere Naganaparasiten in ihrem Blut beherbergen, und auch die menschliche Pathologie hat durch Kochs Malariaforschungen das Vorkommen von Plasmodien bei Kindern kennen gelernt, die zum Teil keine klinischen Erscheinungen der Malaria darbieten.

Wie steht es nun mit der Morphologie und Biologie der pathogenen tierischen und menschlichen Trypanosomen? Wir kennen bisher die Parasiten der Surra, Nagana, Dourine, Caderas, der sogenannten Trypanosomiasis und der Schlafkrankheit. Das von Theiler in Prätoria bei Rindern gefundene *Trypanosoma* ist schon wegen seiner fast doppelten Länge als eine besondere Art aufzufassen. Den obigen Trypanosomen stehen von den ziemlich weit im Tierreich verbreiteten nicht pathogenen Arten am nächsten die Blutparasiten der Ratten, das *Trypanosoma Lewisi*.

Die morphologische Aehnlichkeit des letzteren mit den Surra- und Naganaparasiten ist eine derartige, daß alle früheren Beobachter dieselben für identisch hielten. Erst Koch gelang es 1898 die morphologischen und generellen Verschiedenheiten des *Trypanosoma Lewisi* festzustellen. Auf seine Anregung haben wir das Studium dieser Trypanosomenart verfolgt (5). Wir haben seinerzeit als erste den vollständigen Entwicklungszyklus des *Trypanosoma Lewisi* gegeben, sowie den natürlichen Infektionsmodus der Ratten experimentell aufgeklärt. Wir haben ferner bei unseren diesbezüglichen Immunisierungsversuchen zum erstenmal festgestellt, daß außer der aktiven Immunität bei den Protozoen auch eine passive Immunität mit Sicherheit zu erreichen ist¹⁾. Diese letztere Tatsache ist später nur noch im beschränkten Maße für die Naganaparasiten von Laveran und Mesnil (82), im übrigen für keine andere Protozoenart nachgewiesen worden. Unsere Untersuchungen sind im großen und ganzen von Laveran und Mesnil (52), sowie von Wasielewski und Senn (19), welch letztere sich allerdings mehr auf die Entwicklungsgeschichte der Trypanosomen beschränkt haben, bestätigt worden, wenn wir auch in der Deutung einzelner Befunde, speziell hinsichtlich der Entwicklungsformen zuweilen gefehlt haben. Zu unserer Entschuldigung müssen wir anführen, daß die Technik der Romanowskyschen Färbung, die für das Studium der Entwicklungsformen durchaus erforderlich ist, seinerzeit noch nicht so vollkommen war. In der Tat ist es uns erst mit der von Wasielewski und Senn angegebenen und leicht auszuführenden Modifikation der genannten Färbung sowie später mit einer eigenen und der Leishmanschen (50) gelungen, die Geißel in ihrem ganzen Verlauf bis in die Nähe des von uns als Nucleolus, von Laveran und Mesnil (28) als Centrosoma bezeichneten Gebildes zu verfolgen. Auf Grund dieser Tatsache müssen wir allerdings zugeben, daß unsere frühere Annahme geißelloser Entwicklungsformen nicht zu Recht besteht. Die Vermehrung erfolgt in frei beweglichem Zustande und ist trotz der großen Mannigfaltigkeit der Entwicklungsstadien, die wir seinerzeit sämtlich abgebildet haben, im Prinzip immer die gleiche. Sie charakterisiert sich hauptsächlich als Längsteilung; die Inkonzanz der Teilungsebene scheint allerdings unsere frühere Deutung einer Querteilung nicht ganz von der Hand zu weisen. Neben der vornehmlich auftretenden Längsteilung ist die früher von uns als Segmentierung bezeichnete rasche und mehrfache Teilung des Parasiten, die zur Bildung rosettenförmiger Kolonien führt, ein häufiges Vorkommen. Bei diesem Teilungsmodus ist jedoch die Mutterzelle als solche nicht mehr erkennbar, wie Laveran und Mesnil sehr richtig den Beobachtungen von Wasielewski und Senn entgegenhalten.

Neben dem Studium der Rattentrypanosomen das wir beständig weiter verfolgt haben, waren wir seit 3 Jahren dank der Liebenswürdigkeit des Herrn Nocard, welcher uns zweimal mit Dourine infizierte Kaninchen aus Alfort freundlichst übermittelte, in der Lage, auch die Morphologie und Entwicklungsgeschichte dieser Trypanosomen kennen zu lernen. Zu unseren vergleichenden Trypanosomenstudien waren wir ferner in der Lage zu benutzen: frisches Naganamaterial, ungefärbte und gefärbte Surrapräparate aus Indien, ungefärbte Mal de Caderaspräparate von Herrn Nocard, ungefärbte und gefärbte Präparate von Gambiafieber direkt vom Menschen (von Herrn Dutton) sowie neuerdings Präparate menschlicher Trypanosomen, die durch Ratte und Maus hindurchgeschickt waren (von Herrn Dutton und Todd), sowie endlich gefärbte

Präparate von sleeping-sickness (von Herrn Castellani). Diesen Herren sei auch an dieser Stelle nochmals freundlichst gedankt.

A n m e r k u n g. Während Drucklegung dieser Mitteilung erhielten wir unverhoffterweise aus Alfort eine Sendung mit Caderastrypanosomen infizierter Meerschweichen. Des so früh dahingeshiedenen Meisters von Alfort, Professor E d m o n d N o c a r d s, der uns noch von seinem Kranklager aus dies letzte Zeichen seiner freundschaftlichen Gesinnung gab, werden wir stets in tiefster Verehrung gedenken. Herrn Lignières, der uns die Tiere in so gutem Zusande und zum weiteren Studium besonders geeigneter Weise übermittelte, sprechen wir unseren herzlichsten Dank aus. Eins der Tiere, welches kaum irgendwelche Zeichen der Erkrankung darbot, beherbergte eine große Anzahl von sehr lebhaft beweglichen Parasiten im Blut, welche die weiter unten beschriebenen Kennzeichen der Caderastrypanosomen aufwiesen. Wir sahen bei diesem Tier auch im gefärbten Präparat nur erwachsene Parasiten. Die Ueberimpfung auf Meerschweichen gelang leicht, sowohl auf intraperitonealem wie subkutanem Wege. Bei intraperitonealer Impfung sahen wir bereits am 2. Tag ganz vereinzelt, am 3. Tag in größerer Anzahl in der mittelst Kapillare entnommenen Peritonealflüssigkeit neben erwachsenen Parasiten meistens in Teilung begriffene Entwicklungsformen, vornehmlich mit 2, aber auch eine Anzahl mit 3 und 4 Kernen und der entsprechenden Geißelzahl; wir fanden ferner multiple Teilungsformen, deren Protoplasma sich erst zur Segmentierung anschickte, mit 8 und 10 Kernen, also fast die nämlichen Verhältnisse wie bei den Dourine- und Naganatrypanosomen. Leider ist uns die Färbung der Basalkörperchen bei diesen Teilungsformen bisher nicht so gelungen, daß wir über deren Verhalten bei dem Vermehrungsprozeß schon hier ein vollständiges Bild geben könnten. Am 3. Tage sahen wir bei demselben Meerschweichen noch keine Parasiten im Blute, erst am 4. Tage waren einige erwachsene Parasiten, am 5. auch Entwicklungsformen mikroskopisch nachweisbar. Ueber das Ergebnis der ersten Versuchsreihen, die hauptsächlich zur Aufklärung des Uebertragungsmodus der Caderastrypanosomen analog unseren Dourineversuchen vorgenommen wurden, können wir vielleicht schon demnächst im Anschluß an die letzteren berichten.

Gehen wir nun auf die Morphologie all dieser Parasiten ein. K o c h (1) sagt von den Rattentrypanosomen: „sie sind etwas länger und schlanker als das Surratrypanosoma und unterscheiden sich von demselben besonders dadurch, daß das Kopfende in einen langen schnabelartigen Fortsatz ausläuft, während der Surrparasit am Kopfe fast stumpf endigt.“ Er erklärt weiter, daß er keinen wesentlichen Unterschied zwischen den an den verschiedenen Stellen (Südafrika, Ostafrika, Indien) beobachteten Tsetse- und Surrakrankheiten erkennen konnte und daß er dieselben vorläufig für identisch halte. Die Form des früher als Kopfende, jetzt wohl allgemein als hinteres Ende bezeichneten Teiles des Parasiten ist in der Tat das hauptsächlichste morphologische Merkmal, welches das Rattentrypanosoma von allen anderen Trypanosomen unterscheidet. Bei diesen letzteren, sowohl tierischen wie menschlichen Trypanosomen, läuft das Hinterende mehr oder weniger stumpf aus, obwohl nicht nur bei den verschiedenen Arten, sondern auch bei einer einzelnen in ein und demselben Präparat verschiedene Abstufungen zu verzeichnen sind. Zuweilen zeigt das hintere Ende bei diesen Parasiten sogar ein derartig zugespitztes Aussehen, wie es dem Rattentrypanosoma eigentümlich ist.

Die Formenunterschiede bezüglich des Hinterendes sind nicht so konstant, daß man hieraus eine Unterscheidung der pathogenen Trypanosomen herleiten könnte.

Dasselbe ist unserer Ansicht nach auch hinsichtlich der Parasitenlänge der Fall. Koch hält, wie bereits zitiert, das Rattentrypanosoma für länger als den Tsetse- resp. Surraparazit, während Laveran und Mesnil sowie Bradford und Plimmer (59) gerade den Tsetseparasiten für etwas größer halten. Fügen wir noch hinzu, daß Laveran und Mesnil in ihrer ersten diesbezüglichen Notiz (17. Nov. 1900 [22]) den Tsetseparasiten auf 30—34 μ (die Geißel inbegriffen) bemessen, in ihrer zweiten (29. März 1901 [27]) auf 25—30 μ , in ihrer dritten (25. Jan. 1902 [53]) bei Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund auf 26—27 μ , bei Pferd und Esel auf 28—33 μ , so ersehen wir aus diesen Angaben zur Genüge, daß die Längeverhältnisse der Trypanosomen keinen Anhalt zur Differenzierung geben. Auch schon Bruce hob hervor, daß der Naganaparasit bei den verschiedenen Tierspecies in seiner Größe variiert, welche nach Bradford und Plimmer sogar in den verschiedenen Krankheitsstadien nicht unerhebliche Abweichungen zeigen soll. Die Surratrypanosomen, die bisher im allgemeinen für morphologisch identisch mit den Naganaparasiten galten, halten Laveran und Mesnil (79) nach neueren vergleichenden Untersuchungen für etwas länger als die letzteren. Unsere eigenen Beobachtungen führen uns zu dem Schluß, daß bezüglich der Länge keine konstanten Unterschiede zwischen dem Rattentrypanosoma sowie den pathogenen tierischen und menschlichen Arten festzustellen sind, da selbst in ein und demselben Präparate mitunter längere und kürzere Formen aufzufinden waren. Auch wir waren gleich Koch geneigt, das Rattentrypanosoma für länger zu erklären, vergleichende Messungen zeigten uns jedoch, daß nur die Schlankheit desselben im Gegensatz zu den pathogenen Arten, deren Querdurchmesser wohl infolge der Breite der undulierenden Membran bis zu 1 μ größer ist, diesen Anschein erweckt. Ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal, welches bisher aber weniger hervorgehoben worden ist, scheint uns die Lagerung des Kerns zu sein, welcher sich bei *Trypanosoma Lewisi* meistenteils im ersten Körperdrittel befindet, während er bei sämtlichen anderen Arten ungefähr in der Mitte des Parasitenkörpers gelegen ist. Dieses wären die Hauptpunkte, welche im gefärbten Präparat mit Leichtigkeit das Rattentrypanosoma von den anderen Arten differenzieren. Im frischen Blutstropfen dürfte eine sichere Unterscheidung bedeutend schwerer durchzuführen sein, zumal wir der angeblich lebhafteren Beweglichkeit des *Trypanosoma Lewisi* keine allzu große Bedeutung beilegen.

Welche morphologischen Unterschiede finden sich unter den Seuchen erregenden Trypanosomen der Nagana, Surra, Dourine, Caderas und den beiden bisher bekannten menschlichen Arten? Wir können diese Frage nach unseren eigenen vergleichenden Untersuchungen kurz dahin zusammenfassen, daß wir konstante morphologische Merkmale zwischen den genannten Trypanosomen, wir sprechen vorläufig nur von erwachsenen Formen, mit Ausnahme der Caderasparasiten, nicht feststellen konnten, die uns berechtigten eine Artverschiedenheit hieraus herzuleiten. Wir waren auch nicht im stande, in den Duttonschen und Castellanschen Präparaten irgend welche besonderen Form- oder Strukturverhältnisse zu bemerken, die wir nicht auch bei den tierischen Trypanosomen gesehen hätten. Die mehr oder weniger abgestumpfte Form des

Hinterendes, die Lagerung des Basalkörperchens (Centrosoms) innerhalb oder ober- resp. unterhalb der Vakuole, die stärkere oder geringere Körnung des Protoplasmas, die mehr oder weniger deutlich sichtbare Verbindung des scharf gefärbten Randfadens mit dem Basalkörperchen (ob ein solcher Zusammenhang überhaupt existiert, dürfte schwer nachzuweisen sein), — alle diese morphologischen Einzelheiten zeigen bei den verschiedenen Tierspecies und sogar in ein und demselben Präparat derartige Variationen, daß uns wenigstens eine Differenzierung der einzelnen Arten unmöglich erscheint.

Anders verhält es sich bei den Caderasparasiten, bei denen das Basalkörperchen fast doppelt so klein ist, wie bei allen übrigen Trypanosomen und welches den Farbstoff so schwer annimmt, daß die früheren Beobachter die Existenz desselben überhaupt leugneten. Selbst in einer neueren Arbeit sagt Elmassian (118), der Entdecker des Caderastrypanosoma, daß sich an der Stelle des Basalkörperchens nur „une boule réfringente incolorable“ befinde. Laveran und Mesnil (82) haben zuerst nachgewiesen, daß das kleine Chromatinkorn doch vorhanden sei und sich bei der von ihnen angewandten Färbung (bleu Borrel-éosine-tannique) rot und nicht, wie bei den anderen Trypanosomen, violett färbte. Wir waren mit unserer Färbung nicht so glücklich und sahen selbst in ein und demselben Präparate Parasiten mit deutlich gefärbtem Basalkörperchen, während andere, übrigens sonst gut gefärbte Caderasparasiten dasselbe vermissen ließen. Es wäre vielleicht noch zu erwähnen, daß sich im Protoplasmaleibe der Caderastrypanosomen mehr Granula finden, welche die Chromatinfärbung annehmen, wie bei den anderen Trypanosomen. Im übrigen sind die Form- und Strukturverhältnisse der Caderastrypanosomen von denen der anderen pathogenen Arten nicht verschieden. Die Kleinheit und schwere Färbbarkeit des Basalkörperchens ist demnach in morphologischer Hinsicht das einzige prägnante Unterscheidungsmerkmal der Caderasparasiten. Zur vergleichenden Uebersicht haben wir die verschiedenen Trypanosomenspecies auf einer Tafel zusammengestellt; man wird aus ihr ersehen, daß die pathogenen Arten morphologisch kaum voneinander zu trennen sind.

Den Entwickelungszyklus der Trypanosomen waren wir nur bei der Dourine und der Nagana zu verfolgen in der Lage¹⁾. Der Teilungsmodus charakterisiert sich ebenso wie bei dem *Trypanosoma Lewisi* im allgemeinen als Längsteilung mit dem Unterschiede, daß die Teilungsebene bei den genannten pathogenen Arten konstanter verläuft. Die Teilungsstadien zeigen überhaupt nicht so mannigfaltige Bilder wie diejenigen der Rattentrypanosomen, zumal eine multiple Teilung nicht so häufig zu beobachten ist. Wir haben aber sowohl bei den Dourine- wie Naganaparasiten eine mehrfache Teilung der Mutterzelle konstatieren können, die zur Bildung rosettenförmiger Kolonien führt. Bei der Dourine haben eine solche bereits Schneider und Buffard erwähnt, während wir bezüglich der Naganatrypanosomen eine derartige Angabe in der Literatur nicht auffinden konnten. Entsprechend der im allgemeinen verhältnismäßig nicht sehr großen Anzahl von Parasiten, die bei der Untersuchung der mit Dourine infizierten Tiere mikroskopisch sichtbar sind, haben wir auch die Entwicklung der Dourinetrypanosomen nur mit großer Mühe verfolgen können. Wir glauben uns jedoch zu

1) Bei den Caderastrypanosomen geht der Entwickelungszyklus wohl in der nämlichen Weise vor sich (s. Anmerkung p. 812).

der Annahme berechtigt, daß der Entwicklungszyklus wohl auch bei den anderen pathogenen Trypanosomenarten in gleicher, aber einfacherer Weise verläuft, wie bei dem *Trypanosoma Lewisi*, für das wir seiner Zeit zum ersten Male den vollständigen Fortpflanzungsprozeß aufgestellt haben. Auch bei den menschlichen Trypanosomen dürfte derselbe Teilungsvorgang bestehen; wir sahen in einem Präparate der Castellani'schen Trypanosomen der Schlafkrankheit birnförmige Jugendformen, wie sie bei allen anderen Trypanosomen beobachtet sind¹⁾. Ferner fanden wir in den Präparaten menschlicher Trypanosomen (Gambiasieber), die durch den Tierkörper hindurchgegangen waren, vereinzelte Entwicklungsformen, wie sie allen Arten gemein sind.

Aus vorstehendem glauben wir schließen zu dürfen, daß sich eine Einteilung resp. Artsystematik der beschriebenen Trypanosomen auf Grund ihrer Morphologie und Entwicklungsgeschichte nicht durchführen läßt, und daß wir zur Differenzierung ihre biologischen Eigenschaften zu Hilfe nehmen müssen. In der Tat hat es sich erst durch Immunisierungsversuche erweisen lassen, daß die Parasiten der Surra, Nagana, Dourine und Caderas verschiedene Arten darstellen. Tiere, welche gegen die eine dieser Seuchen immun gemacht worden waren, zeigten sich für die andere empfänglich. Diese Artverschiedenheit der Dourine und Nagana hat Nocard (39), die der Dourine und der Nagana von der Caderasuche Lignières (131) nachgewiesen, während Laveran und Mesnil (137) durch wechselseitige Immunisierung und Infektion die Trennung der Surra, der Nagana und des Mal de Caderas ermöglicht haben. Unsere eigenen diesbezüglichen Experimente ergaben unter anderem, daß gegen das *Trypanosoma Lewisi* aktiv immunisierte weiße Ratten noch für die Dourineparasiten empfänglich waren. Andererseits zeigten sich jedoch einige Ratten, die eine leichte Dourineinfektion überstanden hatten, gegen das *Trypanosoma Lewisi* refraktär. Vergl. hierzu unsere früheren Versuche mit Hamstertrypanosomen²⁾.

Hinsichtlich ihrer Pathogenität resp. Virulenz wäre eine Unterscheidung der genannten Trypanosomenarten fast ebenso unmöglich, wie auf Grund ihrer Morphologie, da die Empfänglichkeit der verschiedenen Tierspecies für ein und dieselbe Trypanosomenart eine sehr verschiedene, welche außerdem noch großen individuellen Schwankungen unterworfen ist. Wir kennen ja überhaupt keinen Mikroorganismus, welcher bei allen Tierarten stets die gleichen Reaktionen auslöst. Ferner müssen wir hier auch die Tatsache erwähnen, daß die pathogenen Trypanosomen im hohen Grade die Eigenschaft besitzen, sich dem Organismus ihres Wirtes anzupassen. Dies haben in unzweideutiger Weise die Untersuchungen über Nagana und Dourine ergeben, die teils in Afrika, teils in Europa angestellt wurden. So waren z. B. die anfänglich für Ratten und Mäuse virulenten Dourineparasiten, die wiederholt durch den Hundekörper hindurchgegangen waren, und welche uns im Kaninchenkörper übermittelt wurden, ihrer Virulenz für diese Nager derartig verlustig gegangen, daß es uns erst nach mehr als 10-facher Passage gelang, weiße Ratten mit dem gewünschten Erfolge zu infizieren.

Vielleicht gelingt es mit der Zeit, durch geeignete Züchtungs- resp. Kulturverfahren, wie ein solches nach vergeblichen Versuchen früherer

1) Diese und andere Entwicklungsformen finden sich auf einer Tafel, die Castellani dem Separatabdrucke des Sambonschen Artikels (129) beigelegt hat.

2) l. c. p. 277.

Autoren zum ersten Male erfolgreich Novy für *Trypanosoma Lewisi* angegeben, eine Differenzierung der einzelnen Trypanosomenarten zu ermöglichen. Die Novysche Methode kann in der Tat als Züchtungsverfahren angesehen werden, wie wir uns selbst durch Versuche mit *Tr. Lewisi* überzeugt haben¹⁾.

In welchem verwandtschaftlichen Verhältnis stehen nun die menschlichen zu den tierischen Trypanosomen? Es lassen sich hierüber nur Vermutungen aufstellen, da bisher nur kurze Angaben über die Tierversuche von Dutton und Todd vorliegen. Sollte es sich in der Tat erweisen, daß die Castellanischen Trypanosomen der Schlafkrankheit durch die Tsetsefliege verbreitet werden, wie Brumpt anzunehmen geneigt ist, so könnte man hieraus vielleicht auf eine engere Verwandtschaft dieser Trypanosomen mit den Naganaparasiten schließen. Doch hierüber werden ja bald weitere Untersuchungen Aufschluß bringen. Ebenso wie die *Anopheles*-Mücke die drei verschiedenen Parasitenarten der menschlichen Malaria zu übertragen vermag, so ist möglicherweise auch die Tsetsefliege oder eine ihr verwandte Stechfliege dazu auszuweisen, verschiedenen menschlichen oder tierischen Trypanosomenarten, deren Entwicklungsgang im Gegensatze zu den drei Parasitenarten der Malaria ein einheitlicher zu nennen ist, als Zwischenwirt zu dienen.

Die Beweisführung der Artverschiedenheit der pathogenen tierischen Trypanosomen auf biologischem Wege, wie sie Laveran und Mesnil im Verein mit Nocard und Lignières gegeben haben, schließt sich folgerichtig der Entdeckung von R. Koch an, daß das Ueberstehen einer Malariafieberart, z. B. einer Quartana, nicht gegen die anderen Arten (*Tropica* und *Tertiana*) und umgekehrt immun macht — eine Tatsache, durch welche die frühere Annahme von der Einheitlichkeit des Malariaparasiten endgültig widerlegt wurde.

Literaturverzeichnis²⁾.

1898.

- 1) Koch, R., Reiseberichte über Rinderpest, Bubonenpest in Indien und Afrika, Tsetse- oder Surrakrankheit, Texasfieber, tropische Malaria, Schwarzwasserfieber. Berlin 1898.
- 2) Kanthack, Durham and Blandford, On Nagana, or Tsetse fly disease. (Proceedings of the Royal Society of London. Vol. LXIV, received 1898. October 27. — Ins Deutsche übersetzt von Nuttall, Hygienische Rundschau. 1898. 15. Dez. No. 24.)
- 3) Nepveu, Sur un trypanosome dans le sang de l'homme. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1898. Séance du 30 décembre. p. 1172.)
- 4) Lingard, Surra report. Appendices, including records of cases, charts and illustrations. 230 p. Bombay 1898.

1899.

- 5) Rabinowitsch, Lydia and Kempner, W., Beitrag zur Kenntnis der Blutparasiten, speziell der Rattentrypanosomen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXX. 1899. p. 251—294.)
- 6) Plimmer, H. G. and Bradford, J. R., A preliminary note on the morphology and distribution of the organism found in the Tsetse-fly-disease. (Veterinarian. Vol. LXXII. 1899. p. 648.)
- 7) — —, Vorläufige Notiz über die Morphologie und Verbreitung des in der Tsetse-

1) Auch zur Kultivierung der Caderastrypanosomen ist das Verfahren geeignet und kann unter Umständen den Tierversuch ersetzen; hierüber werden wir später berichten.

2) Die einschlägige Literatur bis zum Jahre 1898 findet sich in unserer früheren Arbeit, dieses Verzeichnis No. 5; die älteren Arbeiten finden sich in der sehr ausführlichen Zusammenstellung von Hassal, d. Verzeichnis No. 77.

krankheit („Fly Disease“ oder „Nagana“) gefundenen Parasiten. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXVI. 1899. p. 440.)

- 8) Lingard, Report on Surra in equines, bovines, buffaloes, and canines, together with an account of experiments conducted with the Trypanosoma of rats, bandicoots, and fish. 160 p. Bombay 1899.
- 9) Penning, C. A., Over het voorkomen van anaemia pernicioosa infectiosa of wel Surra onder de paarden in Ned.-Indië. (Veeartsenijkundige Bladen voor Ned.-Indië. Deel XII. 1899. p. 123.)
- 10) Nuttall, G. H. F., Die Rolle der Insekten; Arachniden (Ixodes) und Myriapoden als Träger bei der Verbreitung von durch Bakterien und tierischen Parasiten verursachten Krankheiten des Menschen und der Tiere. (Hygien. Rundschau. 1899. No. 5, 6, 8, 10, 12.)
- 11) Schneider, G. et Buffard, M., Note sur un parasite trouvé dans le sang d'animaux atteints de dourine ou maladie du coït. (Bulletin de l'acad. de méd. 1899. 25 juillet.)
- 12) — —, Contribution à l'étude de la dourine. Nouvelles recherches. (Ibid. 1899. 19 septembre.)
- 13) — —, La dourine expérimentale du chien, fonction d'un trypanosome. (Ibid. 1899. 3 octobre.)
- 14) — —, Transmission expérimentale du trypanosome de la dourine par le coït. (Ibid. 1899. 21 novembre.)

1900.

- 15) Schneider et Buffard, La dourine et son parasite. (Recueil de méd. vétérin. Sér. VIII. Fasc. 7. 1900. 15 février. No. 3. 51 p.)
- 16) — —, Le trypanosome de la dourine (Mal du coït). (Arch. de parasit. T. III. 1900. No. 1. p. 124—133.)
- 17) Nocard, Sur des notes de MM. Buffard et Schneider, concernant l'étude expérimentale de la dourine du cheval. (Bulletin de l'acad. de méd. 1900. Séance du 31 juillet. p. 154.)
- 18) Rouget, Sang coloré contenant des Trypanosomes. (Journ. de méd. de Bordeaux. Vol. XXX. 1900. 7 janvier. p. 12.)
- 19) von Wasielewski und Senn, Beiträge zur Kenntnis der Flagellaten des Rattenblutes. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XXXIII. 1900. p. 444.)
- 20) Laveran, A. et Mesnil, S., De la longue conservation à la glacière des trypanosomes du rat et de l'agglomération de ces parasites. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1900. Séance du 6 octobre. p. 816.)
- 21) — —, Sur l'agglutination des trypanosomes du rat par divers sérums. (Ibid. 1900. Séance 10 novembre. p. 939.)
- 22) — —, Sur le mode de multiplication du trypanosome du rat. (Ibid. 1900. Séance du 17 novembre. p. 976.)
- 23) Penning, C. A., Verdere waarnemingen betreffende Surra in Ned.-Indië. (Veeartsenijkundige Bladen voor Ned.-Indië. Deel XIII. Afl. 1. 1900.)
- 24) Vrijburg, A. Surra. (Veeartsenijkundige Bladen voor Ned.-Indië. Deel XIII. Afl. 1. 1900. p. 53.)
- 25) Stephens and Christophers, Distribution of anopheles in Sierra Leone. (Rep. to the Mal. Com. Royal Society. Ser. I. 1900. p. 56.)

1901.

- 26) Stassano, Contribution à l'étude du trypanosome. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1901. Séance du 5 janvier. p. 14.)
- 27) Laveran et Mesnil, Sur le mode du multiplication du trypanosome du Nagana. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1901. Séance du 29 mars. p. 326.)
- 28) — —, Sur la nature centrosomique du corpuscule chromatique postérieur des trypanosomes. (Ibid. p. 329.)
- 29) Stassano, H., Sur la fonction de relation du petit noyau des trypanosomes. Diskussion: Laveran. (Ibid. 1901. Séance du 4 mai. p. 468.)
- 30) Mesnil, F., Les trypanosomes et leur rôle pathogène. [Leçon faite à l'Institut Pasteur et recueillie par P. Gazeau.] (Arch. de méd. navale. 1901. Avril. No. 4. p. 273—295.)
- 31) Carougeau, Note relative à l'existence du trypanosome en Indo-Chine. (Bulletin de la soc. centrale de méd. vétér. Sér. VIII. 1901. Séance du 23 mai. F. 8. No. 12. p. 295.)
- 32) de Does, J. K. F., Bijdrage tot de kennis der trypanosomen-ziekten, in het bijzonder die, welke op Java voorkomen. (Geneeskundig Tijdschr. voor Ned.-Indië. Deel XLI. Afl. 1. 1901. p. 1—38.)
- 33) — —, Boosaardige dekziekte in het Soemedangsche. (III. Rapport.) (Veeartsenijkundige Bladen voor Ned.-Indië. Deel XIV. Afl. 1/2. 1901. p. 20.)

- 34) Elmassian, Mal de Caderas. (Conférence faite au conseil national d'hygiène le 19 mai 1901. Asunción.)
- 35) Voges, Das Mal de Caderas der Pferde in Südamerika. (Berliner tierärztliche Wochenschr. 1901. No. 40. p. 597.)
- 36) Zabala, Joaquin, Mal de Cadera. (Artículo publicado en los Anales del Departamento Nacional de Higiene. Buenos Ayres. 1901. Nov. p. 49—72.)
- 37) Schneider und Buffard, Prophylaxie de la dourine. 15 p. 1 Karte. Lyon 1901.
- 38) — — Syphilis et dourine. (Rev. de méd. 1901. No. 2. p. 135.)
- 39) Nocard, Sur les rapports qui existent entre la dourine et le surra ou le nagana. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1901. Séance du 4 mai. p. 464.)
- 40) Rogers, L., The transmission of the Trypanosoma Evansi by horse flies and other experiments pointing to the probable identity of Surra of India and Nagana or Tsetse-fly disease of Africa. (Proc. of the royal society of London. Vol. LXVIII. 1901. Febr. 14. p. 163.)
- 41) Koch, R., Ein Versuch zur Immunisierung von Rindern gegen Taetsekrankheit (Surra). (Deutsches Kolonialblatt. 1901. No. 24.)
- 42) Schilling, Bericht über die Surrakrankheit der Pferde. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Bd. XXX. 1901. p. 545.)
- 43) Theiler, A., Die Tsetsekrankheit. (Schweizer Arch. f. Tierheilk. Bd. XLIII. 1901. Heft 3 u. 4.)
- 44) Blanchard, R., Mitteilung über eine Trypanosomeninfektion von Kamelen. (Bull. de l'acad. de méd. 1901. Séance du 29 oct. p. 100.)
- 45) Schat, Mitteilung über Surra und Untersuchungen darüber. (Arch. f. Java-Zuckerindustrie. 1901. Lfg. 5.)
- 46) Rost, E. R., Report on the possibility of treating „Surra“ by injections of an antiparasitic serum. (Journ. of pathol. and bacteriol. 1901. p. 285.)
- 47) Maus, L. M., A new epidemic disease among horses in the Philippine Islands. — The equine „Calentura“ of the Philippines. (Monthly report of the board of health for the Philippine Islands. 1901. Sept.)
- 48) Smith, Allen M. and Kinyoun, J. J., A preliminary note on parasitic disease of horses. (Army Pathological Laboratory. Manila. 1901.)
- 49) Nockolds, Coleman, Surra in the Philippines. (American veterinarian Review. Vol. XXV. No. 9. 1901. Dec. p. 743.)
- 50) Leishman, The application of Romanowsky's stain in malaria. (Brit. med. Journ. 1901. Vol. II. p. 635.)
- 51) Doflein, F., Die Protozoen als Parasiten und Krankheitserreger, nach biologischen Gesichtspunkten dargestellt. 274 p. 220 Fig. Jena (G. Fischer) 1901.
- 52) Laveran et Mesnil, Recherches morphologiques et expérimentales sur le trypanosome des rats (Tr. Lewis Kent). (Annales de l'Inst. Pasteur. T. XV. 1901. p. 673—714.)

1902.

- 53) Laveran et Mesnil, Recherches morphologiques et expérimentales sur le trypanosome du Nagana ou maladie de la mouche Tsétsé. (Annal. de l'Inst. Pasteur. T. XVI. 1902. p. 1—55.)
- 54) — —, Sur un nouveau trypanosome des bovidés (Trypanosoma Theileri). (Compt. rend. de l'acad. des sciences. 1902. Séance du 3 mars. p. 512.)
- 55) Bruce, D., Note on the discovery of a new trypanosome. (Lancet. 1902. March 8.)
- 56) Laveran et Mesnil, Des maladies à trypanosomes, leur répartition à la surface du globe. (Janus. 1902. p. 117—130.)
- 57) — —, De l'évolution du Nagana et de sa variabilité suivant les espèces animales. (Bull. de l'acad. méd. 1902. Séance du 3 juin.)
- 58) Laveran, De l'action du sérum humain sur le trypanosome du Nagana (Tr. Brucei). (Compt. rend. de l'acad. des sciences. 1902. Séance du 1. avril. p. 735.)
- 59) Bradford and Plimmer, The Trypanosoma Brucei, the organism found in Nagana or Tsetse fly disease. (Quarterly Journal of microscopical science. N. S. Vol. XLV. 1902. p. 449—471.)
- 60) Slee, John G., Notes on a new disease of horses. (American veter. Review. Vol. XXV. 1902. Jan. p. 819.)
- 61) Nockolds, Coleman, Some further remarks on „Surra“. (American veter. Review. Vol. XXV. 1902. No. 11. Febr. p. 900.)
- 62) Stiles, Ch. W., Trypanosoma in a new rôle. (American medicine. 1902. Febr. 8. p. 240.)
- 63) Curry, J. J., Report on a parasitic disease in horses, mules and caribao in the Philippine Islands. (American medicine. 1902. March 29.)

- 64) Curry, J. J., Surra or Nagana; a report of an acute, fatal epidemic disease affecting horses and other animals. (Ibid. Juli 19.)
- 65) Vrijburg, A., Surra. (Veeartsenijkundige Bladen voor Ned.-Indië. 1902. Deel 14. Afl. 3. p. 207.)
- 66) Schilling, Zweiter Bericht über die Surrakrankheit der Pferde und Rinder im Schutzgebiete Togo. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902. No. 10. p. 452.)
- 67) — —, Immunisierung von Rindern gegen die Surrakrankheit. (Deutsches Kolonialblatt. 1902. 15. Juli. p. 315.)
- 68) — —, Bericht über weitere Versuche betreffend die Tsetsekrankheit. (Ibid. 1. Nov. p. 522.)
- 69) Schneider et Buffard, Parasitisme latent et immunisation dans la dourine. (Journ. de méd. vét. et zootech. Lyon. T. LIII. 1902. 31 mars. p. 146.)
- 70) Elmassian, Mal de Caderas. Flagelosis parasiante de los equideos. (Revista de la sociedad médica Argentina. Buenos Aires 1902.)
- 71) Voges, O., Das Mal de Caderas. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXIX. 1902. p. 323—371.)
- 72) Stiles, Ch. W., Voges' description of Mal de Caderas, a South American trypanosomatic disease of domestic animals. (Journal of comparative medicine and veterinary Archives. 1902. Sept. p. 565.)
- 73) Lignières, J., Contribution à l'étude de la trypanosome des équidés sud-américains connue sous le nom de „Mal de Cadera“. Trypanosoma Elmassiani. (Revista de la sociedad médica Argentina. T. X. 1902. p. 481.)
- 73a) — —, Contribución al estudio de la tripanosomiasis de los equideos sud-americanos conocida bajo el nombre de „Mal de Caderas“ (Trypanosoma Elmassiani). (Semana Médica. Buenos Aires. Vol. IX. 1902. No. 37, 38; Boletín de Agricultura y Ganadería. Vol. II. 1902. No. 40. p. 843.)
- 74) Ziemann, Tsetsekrankheit in Togo (Westafrika). (Berliner klin. Wochenschr. 1902. No. 40.)
- 75) Stuhlmann, F., Notizen über die Tsetsefliege (*Glossina morsistans* Westw.) und die durch sie übertragene Surrakrankheit in Deutsch-Ostafrika. (Ber. über Land- u. Forstwirtschaft in Deutsch-Ostafrika. Herausg. v. kaiserl. Gouvern. v. Deutsch-Ostafrika in Dar-es-Salám. Bd. I. 1902. Heft 2. p. 137—153. Taf. I—II. 4 Abb. im Text.)
- 76) Endlich, R., Die Aussichten für die Bekämpfung des Texasfiebers und der Tsetsekrankheit. (Tropenpflanzer. 1902. No. 6. p. 269—285.)
- 77) Salmon, D. E. and Stiles, Ch. W., Emergency report on surra. With a bibliography of surra and allied trypanosomatic diseases by A. Hassal. 8°. 152 p. (U. S. Departm. of Agricult. Bur. of animal industry. Bull. No. 42.) Washington 1902.
- 78) Laveran et Nocard, Au sujet des mesures prophylactiques à prendre contre les maladies à trypanosomes. (Bull. de l'acad. de méd. 1902. Séance du 1. juli. p. 27.)
- 79) Laveran, Sur l'épizootie de surra, qui a régné en 1902 à l'île Maurice. (Bull. de l'acad. de méd. 1902. Séance du 28 oct. p. 361.)
- 80) Laveran, Au sujet de deux trypanosomes des bovidés du Transvaal. (Compt. rend. de l'académie des sciences. 1902. p. 717. Séance du 3 nov.)
- 81) Laveran et Mesnil, Recherches sur le traitement et la prévention du Nagana. (Ann. de l'Institut Pasteur. 1902. p. 785.)
- 82) — —, Le Nagana et le mal de caderas sont deux entités morbides bien distinctes. (Compt. rend. de l'académie des sciences. 1902. p. 838. Séance du 17 novembre.)
- 83) Armand-Gautier, La médication arrhénique dans la peste, le Nagana, le mal de cadera, la fièvre du Texas, la malaria. (Bull. de l'académie de médecine. 1902. p. 550. Séance du 9 décembre.)
- 84) Kermorgant, Le Nagana au Chari. (Bull. de l'académie de médecine. 1902. p. 574. Séance du 16 décembre.)
- 85) Le Moal, Le Caducée. 1902. 20 décembre.
- 86) Schilling, Die Bekämpfung der Tsetsefliegenkrankheit und ihre wirtschaftliche Bedeutung. (Tropenpflanzer. Bd. VI. 1902. No. 12. p. 616.)
- 87) Rosquier, R., Die Trypanosomenkrankheiten. (Journ. des scienc. méd. de Lille. T. XLIII. 1902.)
- 88) Kummer, Ist der Massaiesel immun gegen die Tsetsekrankheit. (Tropenpflanzer. 1902. No. 10. p. 525.)
- 89) Jürgens, Beitrag zur Biologie der Rattentrypanosomen. (Arch. f. Hyg. Bd. XLII. 1902. p. 265.)
- 90) Buard, G., De la fréquence des trypanosomes dans le sang des rats d'égouts. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1902. p. 877.)

- 91) v. Wasielewski, Ueber die Trypanosoma-Infektion. (Verhandl. des V. Internat. Zoologenkongresses zu Berlin, 12.—16. August 1901. Jena 1902. p. 99—114. 2 Fig.)
- 92) Senn, G., Der gegenwärtige Stand unserer Kenntnisse von den flagellaten Blutparasiten. (Arch. f. Protistenkunde. Bd. 1. 1902. p. 344.)
- 93) Dutton, J., Everett, S., Trypanosome occurring in the blood of man. (Thompson Yates laboratories Liverpool. Vol. IV. Part II. 1902. p. 455.)
- 94) — —, Note on a trypanosoma occurring in the blood of man. (Brit. med. Journ. 1902. September 20.)
- 95) Forde, R. M., Some clinical notes on a european patient in whose blood a trypanosoma was observed. (Journ. of trop. med. 1902. p. 261. September 1.)
- 96) Sander, Beiträge zur afrikanischen Tsetsekrankheit. (Deutscher Kolonialkongreß. Berlin 1902. Oktober.)
- 97) Ziemann, Ist die Schlafkrankheit der Neger eine Intoxikations- oder Infektionskrankheit. (Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. XXXII. 1902. p. 413.)
- 98) Buffard, M. et Schneider, G., Note sur l'existence en Algérie d'une trypanosome autre que la dourine. (Rec. de méd. vétérin. Sér. 8. T. IX. 1902. No. 23. p. 721—727.)
- 99) Blin, Extraits d'un rapport sur une mission au Tonkin. (Bull. de la soc. des scienc. vétérin. de Lyon. 1902. No. 6.)
- 100) Sivori, Frédéric et Lecler, Emmanuel, Le surra américain ou mal de caderas. (Ann. del min. de agricult. sect. de zootecnia, bacteriol. etc. Buenos Aires 1902. T. I. No. 1. p. 1—79. 7 Taf. u. 44 Diagramme.)

1903.

- 101) Schilling, 3. Bericht über die Surrakrankheit der Rinder und Pferde im Schutzgebiete Togo. (Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. XXXIII. 1903. p. 184.)
- 102) —, On Nagana and other Trypanosomes. (Journ. of trop. med. Vol. VI. 1903. No. 3. p. 45.)
- 103) Dutton, J. Everett and Todd, S. H., Preliminary account of the investigations of the Liverpool expedition to Senegambia (1902), with a note by H. E. Annett. (British med. Journ. 1903. February 7.)
- 104) Laveran, Sur deux hippobosques du Transvaal susceptibles de propager Trypanosoma Theileri. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1903. p. 242. Séance du 21 février.)
- 105) Boyce, R. W., Ross, Ronald and Sherrington, Ch. S., The history of the discovery of trypanosomes in man. (Lancet. 1903. February 21.)
- 106) Manson, Patrick, Trypanosomiasis on the Congo. (Journ. of trop. med. T. VI. 1903. p. 85. 16 mars, and British med. Journ. 1903. p. 720. 28 March.)
- 107) — —, Tropical diseases. A manual of the diseases of warm climates. New and revised edition. London (Cassell & Co.) 1903.
- 108) Maxwell-Adams, Alex, Trypanosomiasis and its cause. (British med. Journ. 1903. p. 721. 28 March.)
- 109) Ziemann, Vorläufiger Bericht über das Vorkommen der Tsetsekrankheit im Küstengebiet Kamerun. (Dtsche med. Wochenschr. 1903. No. 15. p. 268.)
- 110) — —, Vorläufiger Bericht über das Vorkommen des Texasfiebers der Rinder in Kamerun (Westafrika) und Weiteres über die Tsetsekrankheit (der Rinder, Schafe, Ziegen, Esel, Pferde, Maultiere, Hunde) sowie über „Tiermalaria“ (der Schafe, Ziegen, Pferde, Esel etc.) (Ibid. No. 16.)
- 111) Rouget, F., Contribution à l'étude de la dourine. (Rec. de méd. vétérin. Sér. 8. T. X. 1903. No. 3. p. 82—90. 15 février.)
- 112) Busquet et Chenot, Sur l'étiologie de la dourine. (Bull. de l'acad. de méd. 1903. p. 564. Séance du 14 avril.)
- 113) Szewczyk, J., Note sur une trypanosome observée dans l'extrême sud-oranais. (Bull. soc. centr. méd. vétér. Sér. 8. T. X. 1903. p. 218—221. 30 avril.)
- 114) Bowers, W. G., Trypanosomes, with special reference to surra. (The Journ. of Comparative Med. and Veterinary Arch. Vol. XXIV. 1903. p. 65. February.)
- 115) Brumpt, E., Extraits de lettres communiquées par Blanchard à l'académie de médecine. (Bull. de l'acad. de méd. 1903. p. 368. séance du 17 mars.)
- 116) Durham, H. E., A trypanosome. (Liverpool School of Tropical Medicine, Memoir VII: Report of the Yellow Fever Expedition to Pará of the Liverpool School of Tropical Medicine and Medical Parasitology. Liverpool 1902. p. 79.)
- 117) Elmæssian, Mal de Caderas. (Veterin. Journ. N. S. Vol. VII. 1903. No. 40. p. 192—196. 1 Taf.)
- 118) — et Migone, E., Sur le mal de Caderas ou flagellose parésiante des équidés Sud-Américains. (Annales de l'Inst. Pasteur. T. XVII. 1903. p. 241.)
- 119) Castellani, Aldo, On the discovery of a species of Trypanosoma in the cerebrospinal fluid of cases of sleeping sickness. Datet Entebbe 5 April 1903. (Proceed. of the Royal Soc. Vol. LXXI. 1903. p. 501. May 14.)

- 120) Bruce, Note by the secretary of the Royal Society. Telegram received May 4. (Proceed. of the Royal Soc. Vol. LXXI. 1903. p. 508. May 14.)
- 121) Kruse, Ueber das Trypanosoma Castellani, den Erreger der Schlafkrankheit der Neger. (Sitzungsber. d. Niederrh. Gesellsch. f. Natur- u. Heilkunde zu Bonn. 18. Mai 1903.)
- 122) Manson, Patrick and Daniels, C. W., A case of trypanosomiasis. (British Med. Journ. 1903. p. 1249. May 30.)
- 123) Leishman, B. B., On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. (British Med. Journ. 1903. p. 1252. May 30.)
- 124) Baker, C. F., Three cases of trypanosoma in man in Entebbe, Uganda. (British Med. Journ. 1903. p. 1254. May 30.)
- 125) Castellani, Researches on the etiology of sleeping sickness. (Journ. of Trop. Med. 1903. June 1.)
- 126) — On the discovery of a species of trypanosoma in the cerebrospinal fluid of cases of sleeping sickness. (The Lancet. 1903. p. 1735. June 20.)
- 127) — Some observations on the morphology of the Trypanosoma found in sleeping sickness. (British Med. Journ. 1903. p. 1431. June 20.)
- 128) Brumpt, E., Maladie du sommeil et mouche Tsé-Tsé. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1903. p. 839. Séance du 27 juin.)
- 129) Sambon, L. W., Sleeping sickness in the light of recent knowledge. (Journ. of Trop. Med. 1903. July 1.)
- 130) Lignières, J., Contribution à l'étude de la trypanosome des équidés sud-américains connue sous le nom de „Mal de Cadera“, Trypanosoma Elmassiani. (Bull. et Mém. Soc. centr. méd. vétér. 8^e série. T. X. 1903. 30 janvier, p. 51—69; 30 février, p. 109—134. 30 mars, p. 164—190.)
- 131) — Contribución al estudio de la diferenciación del Mal de Cadera y de las otras enfermedades causadas por trypanosomas. (Bol. Agricultura y Ganaderia. 3^a année. No. 50. 3 p. Buenos-Aires 1903. 1^{er} févr.)
- 132) Bachmann, Alois et de Elizalde, P., Contribución al estudio del Trypanosoma Elmassiani. (Anales del cirulo medico argentino. 1903. 31 mars. 10 p.)
- 133) Schilling, C., Ueber Tsetsefliegenkrankheit (Surra, Nagana) und andere Trypanosomen. (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. VII. 1903. p. 255.)
- 134) Boigey, Maurice, La trypanose ou maladies à trypanosomes. (Rev. scientif. T. XIX. Sér. 4. 1903. No. 19. p. 583—590.)
- 135) Morel, Existence de la Tsétsé et du Nagana au Chari. (Ann. d'hygiène et de méd. coloniales. T. VI. 1903. No. 2. p. 264—269. 7 Fig.)
- 136) Cazalbou, Note sur un trypanosome du dromadaire au Soudan français. (Bull. de l'acad. de méd. 1903. p. 807. Séance du 30 juin.)
- 137) Laveran et Mesnil, Le Nagana, le Surra et le Caderas constituent trois entités morbides distinctes. (Compt. rend. de sciences. 1903. p. 1529. Séance du 22 juin.)
- 138) — De l'action du sérum humain sur les Trypanosomes du Nagana, du Caderas et du Surra. (Ibid. p. 15. Séance du 7 Juillet.)
- 139) Donovan, On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. (British Med. Journ. 1903. p. 79. July 11.)
- 140) Musgrave, W. E., A preliminary report on Trypanosomiasis (Surra) of horses in the Philippine Islands. (Manila Medical Society. 1903. April 7.)
- 140a) — and Williamsou, N. E., A preliminary report on Trypanosomiasis of horses in the Philippine Islands. (Bureau of public printing. Report issued by the Government laboratory. Manila 1903.)
- 141) McNeal, Ward J. and Novy, Frederick G., On the cultivation of Trypanosoma Lewisi. (Contributions to Medical Research, dedicated to Victor Clarence Vaughan by Colleagues and Former Students of the Department of Medicine and Surgery of the University of Michigan. 1903.)
- 142) Francis, Edward, An experimental investigation of Trypanosoma Lewisi. (Hyg. Laboratory of the Public Health and Marine Hospital Service. Bulletin No. 11. Washington 1903.)
- 143) Martini, E., Ueber die Entwicklung der Tsetseparasiten in Säugetieren. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. XLII. 1903. p. 341.)
- 144) Lühe, M., Flagellate Blutparasiten. (Jahresber d. pathog. Mikroorganismen etc. von Baumgarten und Tangl. 17. Jahrg. 1901. Leipzig (S. Hitzel) 1903.)
- 145) Castellani, Untersuchungen über die Aetiologie der Schlafkrankheit. (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. VII. 1903. p. 382.)
- 146) Grothusen, Ueber das Vorkommen der Tsetse-(Surra)Krankheit beim Zebra. (Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. VII. 1903. p. 387.)
- 147) Bettencourt, Annibal, Kopke, Ayres, de Rezende, Gomes et Mendes,

- Correia, Trypanosoma na doença do somno. (A Medicina Contemporanea. 28. Juni 1903.)
- 148) Blanchard, Expériences et observations sur la marmotte en hibernation. — V. Réceptivité à l'égard des trypanosomes. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1903. p. 1122. Séance du 25 juillet.)
- 149) Laveran et Mesnil, Maladies a trypanosomes, leur repartition à la surface du globe (Fin). (Janus. 15 août 1903. p. 393—402.)
- 150) Hobbs, La trypanosomatose humaine d'après les derniers travaux. (Gaz. hebd. des scienc. méd. de Bordeaux. 2 août 1903.)

Erklärung der Tafel.

- Fig. 1, 2. Rattentrypanosoma (*Tr. Lewisii*).
 Fig. 3, 4, 5. Naganatrypanosomen.
 Fig. 6, 7, 8. Mal de Caderas-Trypanosomen.
 Fig. 9, 10, 11, 12. Surratrypanosomen.
 Fig. 13, 14, 15, 16. Dourinetrypanosomen.
 Fig. 17, 18, 19, 20. Trypanosomen des „Gambia fever“ (Dutton).
 Fig. 21, 22, 23, 24. Trypanosomen der Schlafkrankheit, sleeping sickness (Castellani).
 Fig. 25. Jugendform derselben.
 Färbung nach Romanowsky. Vergrößerung 1000-fach. Zeiss, Apochromat, homog. Imm. 2,0 mm, Kompensationsokular 8.

Nachdruck verboten.

Two Distomes from Canadian Urodela.

By J. Stafford, M.A., Ph.D., Montreal, Canada.

With 1 plate.

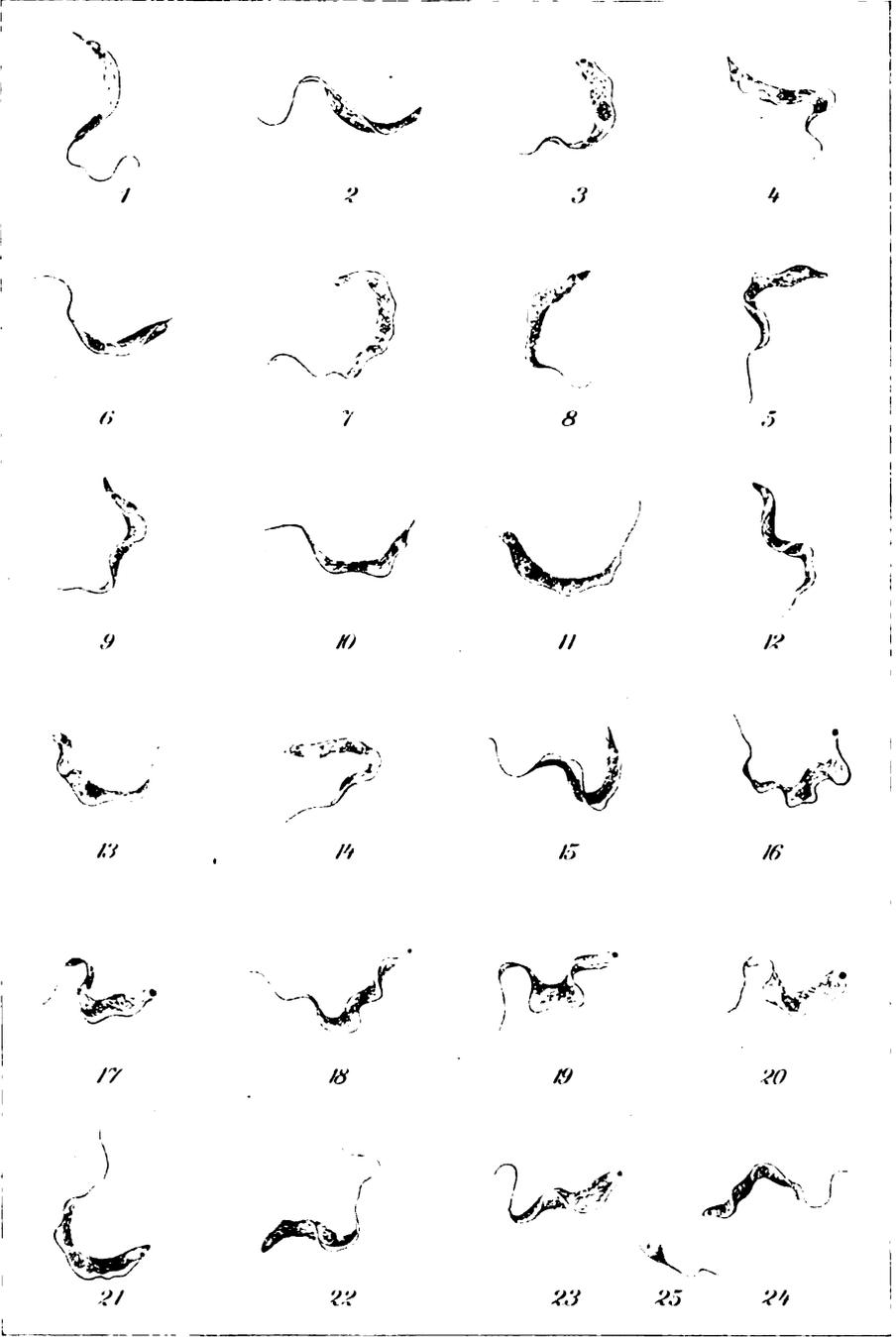
1. *Monocaecum baryurum* (n. g., n. sp.)

(Plate I, Fig. 1, 2, 3.)

The worm here described first came under my notice on the 30th Oct. 1902 when a single individual was found in the rectum of the Menobranch (*Necturus maculatus* Raf.). Of some 70 Menobranchs collected at that time under stones in shallow water along the River St. Lawrence at Point St. Charles near Montreal only five or six have been found to contain this parasite and then only sparingly — one or two in each case. Altogether I have had about ten specimens but it is possible that this does not represent the true number for some of the hosts were kept over winter until April and these contained no parasites. This species occurs throughout the last half of the intestine — not always in the rectum.

In size and shape there are of course the usual variations depending upon conditions of pressure, age etc. A thoroughly representative specimen viewed from the surface under moderate contraction appears somewhat pear-shaped but flattened dorso-ventrally. Preserved and mounted it measures about 2,64 mm in length and 1,26 mm in greatest breadth. From the anterior end to the middle of the ventral sucker is 1,61 mm. In a living worm the anterior end is capable of considerable extension and free movement, but the posterior end (*οἶρα* — behind the ventral sucker — is broad, deep, and heavy (*βαρὺς*) and capable of small, sluggish movements.

The anterior sucker is slightly smaller than the ventral and both generally a little narrower in the transverse than in the longitudinal



direction. In the worm whose dimensions are given above the mouth-sucker measures $0,144 \times 0,138$ mm while the ventral sucker gives $0,241 \times 0,213$ mm. The animal is of a flesh color with light brown patches (eggs) on each side of the posterior half.

The cuticle has embedded in it backwardly sloping, fine spines — abundant and closely set anteriorly but disappearing towards the posterior end.

The mouth (cavity of the anterior sucker) looks downwards and forwards. There is a narrow prepharynx, a small, slightly muscular pharynx and a long, narrow oesophagus which expands at the end into a single, thin-walled, flask-shaped caecum (mono, caecum). This rather insignificant intestinal system, measuring only 1,185 mm in the case described above, falls short of the ventral sucker sufficiently to allow the interposition of a large seminal vesicle.

The transverse commissure of the nervous system crosses above the anterior end of the pharynx and divides on each side into anterior and posterior lateral nerves. Two large excretory vessels unite immediately before opening by the excretory pore at the centre of the posterior end.

The ovary is a conspicuous, spherical body situated on the right side of the ventral sucker. From it proceeds backwards and inwards the oviduct which soon receives the opening of the vitelline reservoir and of the Laurer's canal and continues as ootype through the shell-gland to become the uterus beyond. The shell-gland is situated in the middle line just behind and rather above the level of the ventral sucker. The Laurer's canal passes backwards, inwards and upwards to open in the mid-dorsal line about half way between the ventral sucker and the posterior end of the worm. The proximal part of the uterus acts as a receptacle for sperm, while the rest is a long sinuous tube sufficiently broad to accommodate several rows of eggs and running first backwards towards the excretory pore, then curving outwards and forwards along one side as far as to the level of the ventral sucker, when it again turns backwards and towards the middle line; this it crosses and it then repeats a similar course on the opposite side, first running forwards and outwards to the level of the sucker, then backwards along the side to near the excretory pore, and finally forwards near the middle to the genital opening which is on the ventral surface close to the left side of the ventral sucker. The vitelline glands are paired, right and left, each half situated towards the side but between the level of the sucker and the posterior end. Each is lobed or composed of 6 to 9 follicles which meet together and open into the end of the transverse vitelline duct. This curves forwards and inwards, meets with its fellow of the opposite side to form the reservoir, and the latter opens as already described.

The testes are elliptical bodies situated right and left just behind the level of the ventral sucker. The right one is immediately behind the ovary. From the inner side of each rises a fine vas deferens which runs forwards and inwards to meet its mate above and often just in front of the sucker where they enter a large thin-walled sac, the vesicula seminalis. This lies transversely on a little higher level than the sucker and abuts as already mentioned against the posterior end of the intestine. In mature worms it is filled with ripe sperm. From its left end proceeds the ductus, surrounded by postate glands. The terminal part of the ductus ejaculatorius curves downwards and backwards and

opens along with the end of the uterus into a common genital sinus which in turn leads to the outside through the genital pore at the left side of the ventral sucker. The walls of the terminal part of the ductus form a short, blunt, protrusible penis which in one case I saw everted half way across the sucker. The terminal part of the uterus (vagina) is scarcely thickened but appears slightly beaded.

The eggs vary in shape and size, the largest and most normal in appearance being elliptical with a light-brown shell and measure about $0,028 \times 0,017$ mm.

With the known genera possessing a simple tubular intestine (*Aspidogaster* and its allies, and *Haplospalchnus*) this worm possesses no close affinities. It is most directly related to *Microphallus* (see Literature at end of this paper, No. 1 and 2) with which it appears to agree pretty closely excepting for the size and structure of the intestine. Its organization otherwise, so far as I can judge without having studied *Microphallus*, would entitle it to be counted but a species of that genus. It may appear questionable whether such a difference as exists between the terminal parts of the intestinal systems of *Microphallus opacus* Ward and of this worm is sufficient upon which to propose a new genus. But if anatomical differences are to be taken as distinguishing characteristics of genera (not species) (No. 24, p. 837) then the worm here considered should rank as a new genus. The three worms *Monocaecum baryurum*, *Microphallus opacus* and *Levinseniella pygmaea* form a series of which the only evident anatomical differences are the absence of caeca (or only a single median caecum) in the first, very short caeca in the second, and somewhat longer caeca in the third. Their lengths as given are respectively 2,6, 1,7 and 0,5 mm. In external form, in the relative size, shape, and position of the genital organs, as well as in their structure, there is a very close agreement which is most surprising in the vitellaria, the vesicula seminalis and the position of the genital opening. The first and third possess skin-spines while the second is said to have none. The eggs in the three cases measure 0,028, 0,034, and 0,052 mm in length i. e. inversely proportional to the sizes of the animals. The final hosts are respectively an amphibian, a fish, and a bird, of similar mud-loving habits. The intermediate host is probably a crayfish in all three cases. Of the menobranchs I examined some of those killed soon after capture contained remnants of crayfish (*Cambarus*) and snails (*Physa*) while one had a small frog and another a little menobranch in the stomach.

Of the reported hosts of *Microphallus* viz. *Amia calva*, *Ictalurus punctatus*, *Perca flavescens*, and *Anguilla anguilla*, I have examined some specimens of all but the second, but without finding any specimens. I have no doubt, though, that I shall sooner or later come upon it and be in a better position to compare details of structure.

2. *Brachycoelium hospitale*.

(Plate I, Fig. 4, 5.)

In a former paper (No. 72) I gave a short preliminary notice of this worm. My specimens were taken from the intestine of the spotted Newt (*Diemyctylus viridescens* Raf.). On some or most of the separate copies sent out I wrote that it also occurs in the red-backed Salamander (*Plethodon erythronotus* Green) and mentioned its relationship to *D. crassicole* Rud., both of which remarks were subsequently inserted in a

later note (No. 73). I shall give here a more complete account of its structure and classification, accompanied by a better figure.

On several occasions since its discovery I have come upon this species but only one or two individuals at a time. To give some idea of how seldom it is to be found I may state that my last specimens were procured on the 25th of last month (April) when I examined twenty newts caught the day before. One contained a single *B. hospitale* among some small tape-worms, while another had two individuals of this species but no tape-worms. On May 5th seven more newts were examined but they yielded no worms.

The living animal may reach a length of 4 mm. My largest mounted specimen measures a little under 3 mm in length and 0,5 mm in breadth, while another is $2,6 \times 0,6$ mm, and one of the smallest mature individuals I have is only half these last dimensions. The one from which the drawing is made measured about $2,25 \times 0,5$ mm. They are all so similar in shape, proportions, and appearance that one has no difficulty in recognizing the species. The shape is long-elliptical or linear, with slightly tapering and rounded ends, but flattened a little from above downwards. A section falling across the testes, selected from a series of a worm of the same size as the one figured, measures 5 mm across and 3 mm deep.

In life the worm is of a faint yellowish-pink, but darker in the posterior half when laden with eggs. The anterior sucker is about one-third larger than the ventral sucker. In the specimen figured the measurements in the longitudinal and transverse directions were $0,220 \times 0,207$ and $0,144 \times 0,138$ mm. The ventral sucker is placed on the midventral line, about one-third from the anterior end. In the case of the worm figured the middle of the sucker falls exactly one-third from the anterior end, but of course this does not always occur, for one end of the animal may sometimes be more strongly contracted than the other.

The surface is formed by a cuticle of from 0,01 to 0,02 mm in depth, varying chiefly with the state of contraction of the region, but being also more strongly developed towards the anterior end. It is perfectly smooth and without spines¹⁾.

The intestinal system is but feebly developed, extending through only a quarter to a third of the length of the worm. The mouth or cavity of the anterior sucker looks downwards, its aperture changing in size and shape with the contractions of the muscles of the sucker. The posterior wall is perforated to lead, by a very short pre-pharynx along which the cuticle of the mouth continues, into the pharynx, a small bulb-like, muscular-division of 0,07 mm length and 0,065 mm breadth in the individual described. Succeeding the pharynx is a narrow, thin-walled oesophagus of 0,2 mm length which branches into short right and left intestinal caeca. These are thick walled in consequence of their long epithelial cells, sacculated, about 2 mm long, with their ends

1) In the first paper referred to I stated that there are fine spines in the cuticle of the anterior portion of the animal. In notes jotted down at different times since, I find the skin described as smooth, and I am very certain that the specimens I lately examined with a view to deciding this question were entirely devoid of spines, for I took the greatest care and examined them perfectly fresh when the cuticle showed no signs of disintegration. I have forgotten particulars about the first specimens I described so that for the present two possibilities remain: either there are some individuals with spines and some without, or else I had made a mistake in transcribing from my earliest notes which I no longer preserve. Since similar differences of statement occur about other species I incline towards the former view.

diverging but reaching to about the level of the ventral sucker, the exact spot appearing different according to whether the anterior end of the animal is retracted or extended.

The ovary is a globular, elliptical, or oval-shaped body, $0,14 \times 0,10$ mm in diameter, situated just behind the level of the ventral sucker, but of course in the centre of the vertical depth of the worm, and of about equal frequency on either side of the median sagittal plane of the body. From its inner side arises the oviduct which proceeds in an irregular course across to the opposite side of the body, receiving in quick succession the openings of the receptaculum seminis, the Laurer's canal, and the vitelline reservoir. These are generally upon the posterior side of the oviduct but that depends somewhat upon the manner in which the animal is compressed, for the continuity of these organs has to be determined in the living worm. The first is flask-shaped, generally much smaller than the ovary, and filled with sperm. The second is a narrow tube, running irregularly backwards and upwards to the mid-dorsal surface. The third is formed by the meeting of the transverse ducts from the vitelline glands. On the opposite side from the ovary, or more frequently close behind the ventral sucker, is a much more obscure body, the shell-gland, surrounding that part of the oviduct called the ootype. The next portion of the oviduct acts as a receptacle for sperm and this is succeeded by the long uterus that in adult worms is filled with eggs. The exact course of the uterus appears to vary somewhat in different individuals but is not easy to follow. The uterus is several times the length of the worm and consequently is much folded. In the first place one can recognize a descending part from the ovary to the posterior end of the animal, containing the youngest eggs, and an ascending part from the posterior end to the genital opening, containing older eggs. Most of the descending part is on one side of the animal while the ascending part is on the opposite side. Each half is thrown into a great number of transverse or oblique folds which often overlap or intermingle with those of the opposite side. I have specimens in which the descending part is on the opposite side from the ovary, and about the same number in which it is on the same side as the ovary. The uterus is thin-walled and generally so narrow as to accommodate but a single row of eggs, so that by looking along it one may observe successive stages of development of the contained embryos. Its distal end (vagina) is inconspicuous and opens ventrally, close in front of the ventral sucker.

The testes are a pair of bodies, usually of slightly larger size but similar appearance to the ovary and situated right and left a little behind the level of the ovary, the one on the opposite side from the ovary being usually slightly in advance of the one on the same side as the ovary. Each gives rise to a slender vas deferens which runs anteriorly, the two converging to meet at the hinder end of the penis-sac. This is a thin-walled sac, lying dorsal to and curving over that side of the ventral sucker turned towards the ovary. It is a small organ, rarely reaching behind the posterior edge of the ventral sucker although in the living worm under compression it may do so. Its posterior end is filled by the vesicula seminalis and its anterior end contains the narrow ductus ejaculatorius, the part between ductus and penis-sac being occupied by prostate glands. These parts are small and difficult to clearly determine, but I believe that the terminal part of the ductus

may be everted as a small protrusible penis and either project through the genital opening or be inserted into the vagina. At all events both male and female genital ducts meet here and open by a common genital pore in the mid-ventral line close in front of the ventral sucker.

The vitellaria are composed of somewhat club-shaped follicles, narrowing into longer or shorter necks, and arranged along a longitudinal vitelline duct on each side of the body, from the level of the pharynx to the ovary on one side and to the testis on the other. From each longitudinal duct springs a transverse duct which passes backwards and inwards to meet its mate of the opposite side and form the vitelline reservoir. A follicle is about 0,07 mm long by 0,048 mm broad and is composed of cells, containing granular protoplasm and conspicuous nuclei, arranged about a narrow, central lumen.

All the organs are supported by an intervening parenchyma tissue the outer layers of which contain unicellular skin-glands that open by narrow necks through the cuticle. Some similar glands of rather larger size are to be found deeper in the parenchyma about the oesophagus, their necks running forwards to open round the mouth or some of them apparently just in front of the pharynx.

In the parenchyma are also to be found nerves and excretory ducts which however I have not followed in detail. The terminal part of the excretory system is a long median vessel, situated somewhat dorsally, and originating in the region just behind the testes by the union of left and right affluents. It opens by the excretory pore at the posterior end of the worm.

The youngest eggs are light gray in color, showing the mass of embryonic cells and food-vitellus through their transparent shells. The oldest eggs have yellowish-brown shells and measure about 0,045 by 0,037 mm in length and breadth while alive and little less when preserved.

Brachycoelium hospitale is undoubtedly closely related to *B. crassicolle* Rud. (No. 47). The internal organization, as far as it is known for both worms and as far as one can judge who has a practical acquaintance with only one of them, appears to be identical. It is questionable how much reliance should be placed upon the differences of size and form that occur in the literature. It would seem that *B. hospitale* is somewhat smaller and slenderer than *B. crassicolle* for Minot (No. 55) gives 4 mm as length and 1,2 mm as breadth of worms that, so far as I can judge from his account, were killed in alcohol. This mode of killing may also account for the shortness but greater breadth of the anterior end as shown in his figure. The same size is given also by Dujardin (No. 49). *B. crassicolle* has been reported from *Salamandra*, *Triton*, *Anguis*, *Rana*, and *Bufo*. I have never found *B. hospitale* in our *Amblystoma*, *Rana* or *Bufo*, although I think it should occur in the first.

The genus *Brachycoelium* (Stiles and Hassall, 1898) (No. 65) appears to me well founded and *B. crassicolle* to be its proper type. Minot's drawing and description are sufficient to show the main features of the genus which, so far as I can see, should never have been confounded with *Lecithodendrium* (No. 66, 67, 68). Of course I am only in a position to compare the European types through an actual knowledge of their American representatives. I know a *Brachycoelium* from our newts and I know a *Lecithodendrium* from our bats (No. 73) and

I believe they are both typical of the genera to which I refer them. The first agrees in external features with *B. crassicolle* (Minot, fig. 1) as closely as specimens under different treatment may be expected to do, and in internal structure as far as described for both. The second agrees with *L. chilostomum* Mehl. (= *L. ascidioides* van Ben.) as figured by Looss (No. 64) in nearly every respect excepting that the shape may vary a little and the suckers are of about equal size. Specimens of our *Brachycoelium* and *Lecithodendrium* prepared in the same way measure $2,25 \times 0,5$ mm and $0,92 \times 0,55$ mm. The ventral sucker of the first is one third from the anterior end, in the second it is in the centre of the length of the animal. The ovary of the first is in advance of the testes while in the second it is behind them. The testes of the first are behind the plane of the sucker but in the second they are more widely separated and are situated on each side of or slightly in advance of the plane of the sucker.

Neither does *B. hospitale* belong to the genus *Cymatocarpus* (No. 75). Looss, who founded the genus *Cymatocarpus* (No. 4, p. 593) to include a new species from the intestine of an African turtle, apparently never thought of comparing it with *B. crassicolle* although he discussed the latter at considerable length. *Cymatocarpus undulatus* Looss, irrespective of its larger size and more robust nature has equal sized suckers, the oesophagus is longer in proportion, the ventral sucker, ovary, testes and vitellaria are placed farther back towards the centre of the body, while the end organs of the genital system are of much vaster proportions. In this connection it might be stated that *D. heteroporum* Duj. can not be counted a *Brachycoelium* (No. 75, p. 903, fig. 73). It certainly should be placed in a different genus from *B. crassicolle* which has been already done by Looss (No. 81, p. 611) who made it the type of his new genus *Pycnoporos*.

Montreal, May 23, 1903.

Related Literature.

1. *Microphallus opacus* Ward.

- 1) Ward, On the parasites of the Lake Fish. (Proceed. of the Amer. microscop. Soc. Vol. XV. 1894. p. 173—182. Pl. I. Fig. 1—6. *Distoma opaca* n. sp.)
- 2) MacCallum, On the anatomy of two Distome parasites of freshwater fish. (Veterin. magaz. Vol. II. 1895. *Distoma opaca*.)
- 3) Stossich: Lo Smembramento dei Brachycoelium. (Boll. soc. adriat. sci. nat. Vol. XIX. 1899. p. 9. *Levinsenia opacum*.)
- 4) Looss, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Trematodenfauna Aegyptens. (Zool. Jahrb. Bd. XII. 1899. p. 620, 621. *Dist. opacum*.)
- 5) Lühe, Zur Kenntnis einiger Distomen. (Zool. Jahrb. Bd. XXII. 1899. p. 538.)
- 6) Jägerskiöld, Levinsenia (Distomum) pygmaea, etc. (Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXVII. 1900. p. 732—740.)
- 7) Ward, Notes on the parasites of the Lake Fisch. (Studies zool. Lab. Univ. Nebraska. 1901. p. 175—187. 1 pl. 5 fig. *Microphallus opacus*.)
- 8) Pratt, Synopses etc. The Trematodes. (Amer. naturalist. Vol. XXXVI. 1902. p. 903, 959. Fig. 75.)

2. *Levinseniella brachysomum* Crep.

- 9) Rudolphi, Entoz. Synop. 1819. p. 120. *D. calidris*.
- 10) Dujardin, Hist. nat. d. Helm. 1845. p. 447. *D. calidris*.
- 11) Creplin, Wiegmanns Arch. 1846. p. 134, 136, 142; 1849. p. 48. *D. brachysomum*.
- 12) Diesing, Syst. Helm. I. 1850. p. 397.
- 13) — —, Wiener Sitzber. XXXII. 1858. p. 354.
- 14) Creplin, Compt. rend. T. LXXXI. 1875. p. 475—476.
- 15) Villot, Ann. d. sci. nat. Sér. VI. T. VIII. 1878. p. 22. Pl. V. Fig. 7.)

- 16) von Linstow, Arch. f. Naturg. Bd. XLVIII. 1882. p. 20.
 17) — —, Compendium d. Helm. 1878—1889. p. 136.
 18) Stossich, I Dist. d. Uccelli. 1892. p. 6.
 19) Braun, Bronns Klassen etc. 1879—1893. p. 583.
 20) Stossich, (No. 3 above) p. 10.
 21) Looss, (No. 4) p. 617, 620, 622, 768.
 22) Lühe, (No. 5) p. 536—538.
 23) Ward, (No. 7) p. 175—176, 184.
 24) Looss, Ueber neue und bekannte Trematoden. (Zool. Jahrb. Bd. XVI. 1892. p. 703—705.)

3. *Levinseniella pygmaea* Lev.

- 25) Levinsen, Bidrag til kundskab om Grönlands Trematodfauna. 1881. p. 73. Pl. III. Fig. 3. *Distomum pygmaeum* Lev. n. sp.
 26) Stossich, (No. 18) p. 5.
 27) — —, (No. 3) p. 10. *Levinsenia pygmaea*.
 28) Lühe, (No. 5) p. 537—538. Note 30.
 29) Jägerskiöld, Bergen Mus. Aarborg. 1899. p. 14—15.
 30) — —, (No. 6) p. 732.
 31) Ward, (No. 7) p. 175—176, 184. *Levinseniella pygmaea*.
 32) Jägerskiöld, Centralbl. f. Bakt. etc. Bd. XXX. 1901. p. 982. *Spelotrema pygmaea*.
 33) Stiles, Notes on Parasites. 1902. No. 58. *Levinseniella pygmaea*.
 34) Looss, (No. 24), p. 704 706, 784—86, 809, 826.
 35) Pratt, (No. 8) p. 903, 959. Fig. 71.

4. *Levinseniella macrophallos* von Linst.

- 36) von Linstow, Arch. f. Naturg. Jahrg. XLI. Bd. I. 1875. p. 190. Taf. II. Fig. 12. *Dist. macrop.*
 37) — —, Ibid. 1877. p. 183.
 38) Braun, (No. 19) p. 585.
 39) Stossich, (No. 18) p. 5.
 40) — —, (No. 3) p. 10. *Levinsenia macrophallos*.
 41) Lühe, (No. 5) p. 536.
 42) Looss, (No. 4) p. 620.
 43) Ward, (No. 7) p. 175, 184.
 44) Looss, (No. 24) p. 704.

5. *Brachycoelium crassicolle* Rud.

- 45) Frölich, Beschreib. ein. neuen Eingew. (Naturf. Bd. XXIV. 1789. p. 119. Taf. IV. Fig. 8—10. *Fasciola salamandrae*.)
 46) Zeder, Naturg. d. Eingew. 1800. p. 215. *Dist. salamandrae*.
 47) Rudolphi, Entoz. Hist. 1809. p. 378. *Dist. crassicolle*.
 48) — —, (No. 9), p. 102, 385.
 49) Dujardin, (No. 10) p. 404.
 50) Creplin, (No. 11) p. 147—148.
 51) Diesing, (No. 12) p. 356.
 52) Baird, Catal. Entoz. London. 1853. p. 52.
 53) Diesing, (No. 13) p. 339.
 54) Cobbold, Synop. Dist. 1859. p. 18.
 55) Minot, On Dist. crassicolle Rud. (Mem. Boston soc. nat. hist. 1878. p. 1—12. Pl. I.)
 56) von Linstow, Arch. f. Naturg. Bd. XLV. 1879. p. 183. *D. flavocinctum*.
 57) Braun, Paras. des Menschen. 1883. p. 41. Fig. 8. 2. Aufl. 1895. p. 128. Fig. 45.
 58) — —, Zootom. Prakt. p. 106. Fig. 40.
 59) — —, (No. 19) p. 672.
 60) Stossich, Dist. degli anfib. 1889. p. 4.
 61) — —, I Dist. d. Rettili. 1895. p. 4, 20.
 62) — —, Note parasit. 1897. p. 9.
 63) — —, Saggio di una Fauna Elmintologica. 1898. p. 32.
 64) Looss, Die Dist. unserer Fische u. Frösche. 1894. p. 84.
 65) Stiles Hassall, An Inventory etc. (Arch. de Parasit. 1898. p. 83. *Brachycoelium crassicolle*.)
 66) Stossich, (No. 3) p. 9. *Lecithodendrium crassicolle*.
 67) Looss, (No. 4) p. 611, 614.
 68) Lühe, (No. 5) p. 536.
 69) — —, Ueber ein. Dist. (Centralbl. f. Bakt. etc. 1900. p. 562.)

- 70) Stiles, Diskussion etc. (Zool. Jahrb. Bd. XV. 1901. p. 201.)
 71) Looss, (No. 24) p. 705, 768, 772, 814, 815, 816, 818, 821, 822, 832.

6. *Brachycoelium hospitale*.

- 72) Stafford, Some undescribed Trematodes. (Zool. Jahrb. Bd. XIII. 1900. p. 403. Pl. XXXVI, Fig. 3. *Distomum hospitale* n. sp.)
 73) — —, Notes on Worms. (Zool. Anz. Bd. XXV. 1902. p. 483. *Distomum [Brachycoelium] hospitale*.)
 74) Looss, (No. 24) p. 822.
 75) Pratt, (No. 8) p. 903, 959. *Cymatocarpus hospitale*.

7. *Pycnoporos heteroporus* Duj.

- 76) Dujardin, (No. 10) p. 402. *Dist. heteroporus* n. sp. ♀
 77) Diesing, (No. 12) p. 382.
 78) Brandes, Helminthologisches. (Arch. f. Naturg. 1888. p. 247—251. Taf. XVII. Fig. 4.)
 79) Braun, (No. 19) Pl. XXIII. Fig. 3.)
 80) Stossich, (No. 3) p. 9. *Lecithodendrium heteroporum*.
 81) Looss, (No. 4) p. 614.
 82) — —, (No. 24) p. 772.
 83) Pratt, (No. 8) p. 903. Fig. 73.

8. *Lecithodendrium chilostomum* Mehlis (= *Lecith. ascidioides* van Ben.)

- 84) Mehlis, Isis. 1831. p. 187. *Dist. chilostomum*.
 85) van Beneden, Mém. acad. roy. de Belg. T. XL. 1873. p. 30. *Dist. ascidioides*.
 86) Looss, (No. 64) Taf. III. Fig. 51.
 87) — —, Rech. sur la faune paras. de l'Egypte. 1896. p. 86. *Lecithodendrium ascidioides*.
 88) Stossich, (No. 3) p. 8.
 89) Lühe, (No. 5) p. 535, 536.
 90) Looss, (No. 4) p. 610.
 91) Braun, Eine Bemerk. üb. d. Fasc. d. Chirop. (Zool. Anz. Bd. XXIII. 1900. p. 387—391.)
 92) — —, Trem. d. Chirop. (Ref. im Zool. Centralbl. 1901. p. 631.)

Description of plate.

Fig. 1, 2, 3. *Monocaecum baryurum*.

Fig. 4, 5. *Brachycoelium hospitale*. *C* = intestinal caecum, *Ex* = excretory pore, *LC* = Laurer's canal, *M* = mouth and mouth-sucker, *N* = transverse nerve commissure, *O* = ovary, *Oe* = oesophagus, *P* = penis apparatus, *Ph* = pharynx, *RU* = receptaculum seminis uterinum, *SG* = shell-gland, *SV* = seminal vesicle, *T* = testis, *U* = uterus, *V* = ventral sucker, *VG* = vitelline glands, *Vg* = vagina.

Fig. 1. *Monocaecum baryurum*, magnified about 25 times natural dimensions, from the ventral surface. To the right of the ventral sucker is the genital opening. At the sides of the sucker may be seen the vasa deferentia running from the testes to the seminal vesicle. Immediately behind the sucker is the vitelline reservoir, receiving the two vitelline ducts from the vitelline glands *VG*. Just behind the vitelline reservoir is the ootype surrounded by the shell-gland.

Fig. 2. Median sagittal section through the same worm.

Fig. 3. Five transverse sections through the same worm.

Fig. 4. *Brachycoelium hospitale*, magnified about 25 times, from the ventral surface. About the oesophagus are unicellular glands. Close in front of the ventral sucker is the genital opening receiving the penis apparatus to the right and the vagina underlying the sucker. To the right of Laurer's canal is the seminal receptacle, to the left of the canal is the vitelline reservoir connected by ducts with the glands *VG*.

Fig. 5. Five transverse sections through the same worm.

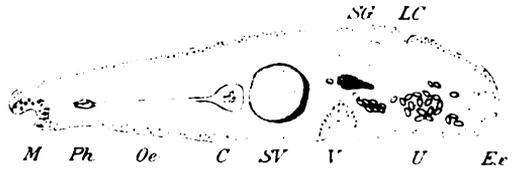
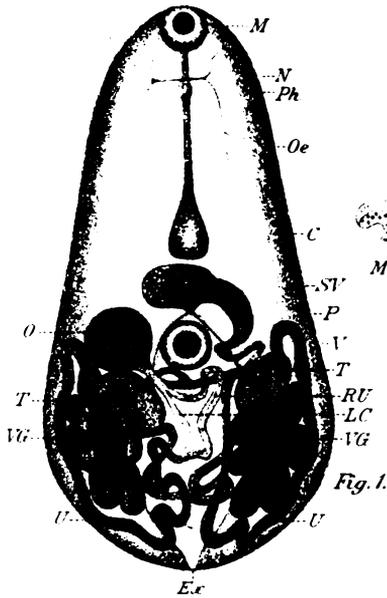


Fig. 2.

Fig. 1.



Fig. 3.

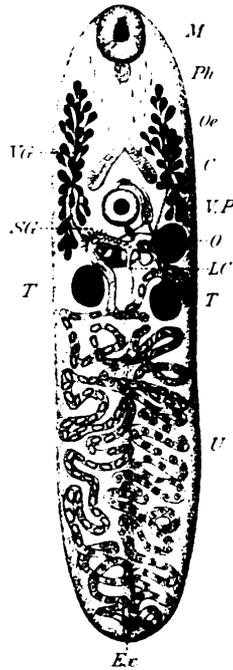


Fig. 4.

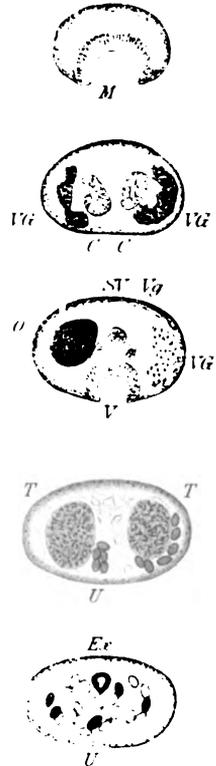


Fig. 5.

Nachdruck verboten.

Ueber die Einwirkung von Glykogen auf hämolytische Vorgänge.

[Aus dem pharmakologischen Institute der Universität Bonn.]

Von Prof. Dr. Wendelstadt, Assistent am pharmakologischen Institute.

Bei einer Untersuchung, welche auf einem anderen Gebiete liegt, mußte ich die Frage entscheiden, ob das Glykogen eine Einwirkung auf hämolytische Prozesse ausübt, wie dies eine Reihe von anderen bekannten Substanzen tut. Bei den ersten Versuchen in dieser Richtung fielen sofort einige Erscheinungen auf, die eine genauere Untersuchung nahelegten. Die ersten Experimente, welche ich ebenso wie die weiteren in Gemeinschaft mit Fräulein T. Fellmer ausführte, ergaben, daß das Glykogen hemmend auf die Hämolyse wirkte bei den natürlichen angeborenen Hämolysinen des Normalserums, aber gar nicht bei den künstlichen durch Blutinjektionen gewonnenen des Immunsersums. Dieser Unterschied zwischen der Wirkung bei den beiden Serumarten trat immer hervor, wenn wir ohne Rücksicht auf eine genaue Bestimmung der zur Lösung notwendigen Menge von Ambozeptor und Komplement abgestufte Quantitäten der Serumarten gegenüber den passenden Blutkörperchen prüften. Die genaue Bemessung der Ambozeptoren und Komplemente hatten wir zunächst außer acht gelassen. Ich werde später darauf zurückkommen müssen bei dem Versuch einer Erklärung des Einflusses von Glykogen, die, wie ich jetzt schon vorwegnehmen möchte, zu dem Resultate führte, daß der Unterschied zwischen der Einwirkung bei natürlichen und bei künstlichen hämolytischen Serumarten nur auf dem bei beiden verschiedenen Mengenverhältnissen von Ambozeptoren und Komplementen beruht.

Das Glykogen ist in seiner Wirkung auch dadurch charakteristisch, daß es dieselbe nur dann bei natürlichem angeboren hämolytischem Serum entfaltet, wenn es mit dem Serum eine Zeitlang zusammengelesen worden ist, ehe die betreffenden roten Blutkörperchen zugesetzt werden. Mischt man sofort Glykogen, Serum und Blut, so tritt keine hemmende Wirkung zu Tage.

Die Versuche wurden angesetzt mit einem ganz reinen Glykogen, das Herr Dr. Nerking¹⁾ aus Pferdefleisch gewonnen hatte und mir freundlichst überließ. Dieses Präparat ist ganz neutral und übt keinerlei sichtbare Wirkung auf die roten Blutkörperchen aus. Die Präparate, welche im Handel bezogen werden können, sind zum Teil nicht so rein, reagieren sauer und lösen Blutkörperchen auf.

Bei allen Versuchen wurde eine Lösung von 1 Teil Glykogen auf 15 Teile 0,85-proz. Kochsalzlösung benutzt. Die Konzentration dieser Lösung ist ganz willkürlich angenommen. Man beobachtet die gleiche Wirkung bei sehr geringerem Zusatz. Eine bedeutende Erhöhung des Glykogengehaltes wirkt auch nicht stärker. Als geringste Menge

1) Die Darstellungsmethode findet sich bei J. Nerking, Ueber die elementare Zusammensetzung und das Invertierungsvermögen des Glykogens. (Pflügers Arch. Bd. LXXXV. p. 321.)

von Glykogen, die noch eine merkbare Wirkung ausübte, fanden wir 0,5 ccm einer Lösung 1 : 1 500 000.

Die Versuchsanordnung war die folgende. Mit dem Serum, das geprüft werden sollte, wurden je 2 Reihen von Reagenzgläsern in abgestuften Mengen beschickt und in allen die Flüssigkeitsmenge durch Zusatz von 0,85-proz. Kochsalzlösung auf 2 ccm gebracht. Der einen Pfeife wurden je 3 Tropfen der Glykogenlösung zugefügt, die andere diente als Kontrolle. Alle Reagenzgläser wurden 1 Stunde in den Brutschrank bei 37° gebracht und darauf jedem 2 Tropfen des passenden defibrinierten Blutes zugesetzt. Die Mischung blieb noch $\frac{1}{2}$ Stunde im Brutschrank und wurde dann in ein kühles Zimmer gestellt. Die folgende Zusammenstellung der Versuche, welche ohne vorherige Bestimmung der zur Lösung notwendigen Menge Ambozeptoren und Komplemente nur durch einfache Abstufung der zugesetzten Mengen des blutlösenden Serums angesetzt wurden, soll ein Beleg sein für die bei dieser Versuchsanordnung stets eintretende Verschiedenheit der hemmenden Wirkung des Glykogens einerseits bei Normalserum und andererseits bei Immunserum.

Versuch 1.

Normales Kaninchenserum löst Ziegenblut. Die erste Tabelle gibt die Lösungsfähigkeit in unserem Falle an.

Normales Kaninchenserum	Ziegenblut	Lösung
1) 0,5 ccm	2 Tropfen	} komplett
2) 0,4 "	2 "	
3) 0,3 "	2 "	
4) 0,2 "	2 "	
5) 0,1 "	2 "	schwach

Dasselbe Serum mit Glykogenzusatz löst Ziegenblut in folgender Stärke:

Normales Kaninchenserum	Glykogenlösung	Ziegenblut	Lösung
1) 0,5 ccm	3 Tropfen	2 Tropfen	} schwache Spur
2) 0,4 "	3 "	2 "	
3) 0,3 "	3 "	2 "	
4) 0,2 "	3 "	2 "	
5) 0,1 "	3 "	2 "	

Bei diesen Tabellen und allen folgenden ist die Auffüllung mit 0,85-proz. Kochsalzlösung zu 2 ccm zu ergänzen und die Zeit der Einwirkung des Brutschrankes einzuschreiben.

Versuch 2.

Normales Hundeserum löst Meerschweinchenblut. Die Prüfung der Lösung ergab folgendes:

Normales Hundeserum	Meerschweinchenblut	Lösung
1) 0,3 ccm	2 Tropfen	} komplett
2) 0,2 "	2 "	
3) 0,1 "	2 "	
4) 0,09 "	2 "	
5) 0,08 "	2 "	
6) 0,07 "	2 "	
7) 0,06 "	2 "	
8) 0,05 "	2 "	stark
9) 0,04 "	2 "	} schwach
10) 0,03 "	2 "	
11) 0,02 "	2 "	
12) 0,01 "	2 "	

Dasselbe Serum mit Glykogenzusatz löst in folgender Weise:

Normales Hundeserum	Glykogenlösung	Meerschweinchen- blut	Lösung
1) 0,3 ccm	3 Tropfen	2 Tropfen	} Spur } 0
2) 0,2 "	3 "	2 "	
3) 0,1 "	3 "	2 "	
4) 0,09 "	3 "	2 "	
5) 0,08 "	3 "	2 "	
6) 0,07 "	3 "	2 "	
7) 0,06 "	3 "	2 "	
8) 0,05 "	3 "	2 "	
9) 0,04 "	3 "	2 "	
10) 0,03 "	3 "	2 "	
11) 0,02 "	3 "	2 "	
12) 0,01 "	3 "	2 "	

Versuch 3.

Normales Meerschweinchenserum löst Hammelblut. Es ergab sich folgende Lösungsfähigkeit:

Normales Meerschweinchenserum	Hammelblut	Lösung
1) 0,5 ccm	2 Tropfen	} stark
2) 0,4 "	2 "	
3) 0,3 "	2 "	} schwach
4) 0,2 "	2 "	
5) 0,1 "	2 "	

Dasselbe Serum mit Glykogenzusatz ergab folgendes Resultat:

Normales Meerschweinchenserum	Glykogenlösung	Hammelblut	Lösung
1) 0,5 ccm	3 Tropfen	2 Tropfen	Spur
2) 0,4 "	3 "	2 "	} 0
3) 0,3 "	3 "	2 "	
4) 0,2 "	3 "	2 "	
5) 0,1 "	3 "	2 "	

Die hemmende Wirkung des Glykogens, die aus diesen Tabellen ersichtlich ist, kommt in gleicher Weise auch bei anderen natürlichen Hämolytinen zur Geltung. So ergaben das gleiche Resultat Versuche mit einer Reihe von normalen Serumarten; Ziegenserum und Pferdeblut, Ziegenserum und Kaninchenblut, Meerschweinchenserum und Schweineblut, Ochsenblut und Meerschweinchenblut, Kaninchenblut und Pferdeblut, Hundeserum und Kaninchenblut, Ochsenblut und Kaninchenblut.

Auch die natürlichen Hämolytine des Aalserums werden durch Glykogen beeinflusst. Aalserum löste Kaninchenblut in einer Reihe von 20 Reagenzgläsern, in denen das Serum von 0,1 ccm bis zu 0,001 ccm abgestuft war, bis zum letzten auf, während die Lösung nach Zusatz von Glykogen nur bis 0,01 ccm Serum ging.

Im Gegensatz zu dieser Hemmung, die das Glykogen bei den natürlichen Hämolytinen ausübte, blieb es bei künstlich erworbenen Hämolytinen bei gleicher Versuchsanordnung ohne Einfluß. Serum von Ziegen, die mit Hammelblut, Ochsenblut oder Schweineblut vorbehandelt waren, und Serum von Kaninchen, welche mit Ochsenblut injiziert worden waren, löste die entsprechende Blutart mit und ohne Glykogenzusatz absolut gleich.

Einem Kaninchen wurden neben seinen natürlichen Hämolytinen für Ziegenblut, nachdem der Einfluß des Glykogens auf diese experimentell festgestellt war, durch Injektion von Ziegenblut künstliche Hämolytine

beigebracht. Während vor der Injektion die Einwirkung des Glykogens auf die lösende Kraft der natürlichen Hämolytine eine ganz deutliche war, zeigte sich nach 2 Injektionen von zusammen 50 ccm Ziegenblut gar keine Einwirkung mehr von Glykogen auf die Hämolyse. Dadurch, daß zu den normal vorhandenen Hämolytinen für Ziegenblut die künstlich erzeugten hinzukamen, wurde die Wirkung des Glykogens total aufgehoben.

Bei dem Serum einer Ziege, die mit Hammelblut injiziert worden war, wurde die Hämolyse für Hammelblut durch Glykogen nicht beeinflusst, dagegen zeigte sich eine deutliche Wirkung auf die dem Serum der Ziege eigentümlichen natürlichen Hämolytine für Kaninchenblut. Die Versuche zeigen, daß das normale Serum in seiner Wirkung auf Blutkörperchen durch Glykogen deutlich gehemmt wird, während eine solche Hemmung bei dem Immunserum nicht erkennbar wird.

Die Zusammensetzung eines Normalserums unterscheidet sich von der eines Immunserums durch die größere Menge von Ambozeptoren in dem letzteren¹⁾. Hierin mußte zunächst die Ursache für die verschiedene Glykogenwirkung gesucht werden. Die Experimente zeigen auch, daß die hemmende Wirkung des Glykogens durch eine Vermehrung der Ambozeptoren beeinflusst wird.

Bei den hierher gehörigen Versuchen wurden die zur Lösung notwendigen Ambozeptoren und Komplementmengen genau bestimmt nach der von H. Sachs²⁾ ausführlich beschriebenen Methode.

Die Ambozeptoren lieferte zu den Versuchen das inaktivierte Serum einer mit Hammelblut mehrfach injizierten Ziege und die Komplemente wurden durch normales Ziegen Serum herbeigeschafft. Je nachdem das inaktivierte Serum der Hammelziege mit normalem Ziegen Serum gemischt wurde, war das Mengenverhältnis von Ambozeptoren und Komplementen, welche zusammen die Lösung von Hammelblutkörperchen veranlaßten, ein verschiedenes. Wir nahmen eine konstante Menge Komplement, die in 0,3 ccm normalem Ziegen Serum enthalten war, und setzten verschiedene Mengen von Ambozeptoren zu. Zu der Mischung fügten wir 3 Tropfen Glykogenlösung (1 : 15) und stellten sie 1 Stunde in den Brutschrank bei 37°. Darauf wurde experimentell festgestellt, daß 0,3 ccm normales Ziegen Serum (Komplement) mit 0,2 ccm inaktiviertem Serum der Hammelziege (Ambozeptor) + Glykogen gerade ausreichten, 2 Tropfen Hammelblut komplett zu lösen. Verschoben wir das Mengenverhältnis zu Ungunsten der Ambozeptoren, d. h. setzten wir weniger inaktives Serum der Hammelziege zu, so nahm die Lösung der Hammelblutkörperchen ab, d. h. die hemmende Wirkung des Glykogens trat zu Tage. Viel Ambozeptor hebt also die hemmende Wirkung des Glykogens auf. Ein gleichzeitig ohne Glykogenzusatz angestellter Kontrollversuch, bei welchem ebenfalls die Serum Mischung 1 Stunde in den Brutschrank gestellt wurde, zeigte schon eine komplette Lösung bei 0,3 ccm normalem Ziegen Serum + 0,04 ccm inaktiviertem Serum der

1) „Das Immunserum unterscheidet sich von dem normalen einzig und allein durch seinen Gehalt an inaktivem Immunkörper.“ v. Dungern, Die Antikörper. p. 40. Jena 1903.

2) Sachs, H., Hämolytine und ihre Bedeutung für die Immunitätslehre. (Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse d. path. Anatomie. Jahrg. VII p. 781.)

Hammelziege, also bei sehr viel weniger Ambozeptor bei gleicher Menge Komplement.

A.

Inakt. Hammel- ziegenserum (Ambozeptor)	Normales Ziegen- serum (Komplement)	Glykogen- lösung	Hammelblut	Lösung
1) 0,2 ccm	0,3 ccm	3 Tropfen	2 Tropfen	komplett fast komplett stark } Spur } 0
2) 0,1 "	0,3 "	3 "	2 "	
3) 0,09 "	0,3 "	3 "	2 "	
4) 0,08 "	0,3 "	3 "	2 "	
5) 0,07 "	0,3 "	3 "	2 "	
6) 0,06 "	0,3 "	3 "	2 "	
7) 0,05 "	0,3 "	3 "	2 "	
8) 0,04 "	0,3 "	3 "	2 "	
9) 0,03 "	0,3 "	3 "	2 "	

B.

Inakt. Hammel- ziegenserum (Ambozeptor)	Normales Ziegen- serum (Komplement)	Hammelblut	Lösung
1) 0,2 ccm	0,3 ccm	2 Tropfen	} komplett } fast komplett
2) 0,1 "	0,3 "	2 "	
3) 0,09 "	0,3 "	2 "	
4) 0,08 "	0,3 "	2 "	
5) 0,07 "	0,3 "	2 "	
6) 0,06 "	0,3 "	2 "	
7) 0,05 "	0,3 "	2 "	
8) 0,04 "	0,3 "	2 "	
9) 0,03 "	0,3 "	2 "	

Ebenso wurde die Menge des zur Lösung nötigen Komplements mit dem gleichen Hammelziegenserum festgestellt.

Inakt. Hammel- ziegenserum (Ambozeptor)	Aktives Ziegen- serum (Komplement)	Glykogen- lösung	Hammelblut	Lösung
1) 0,2 ccm	0,2 ccm	3 Tropfen	2 Tropfen	} komplett } fast komplett } stark halb Spur
2) 0,2 "	0,1 "	3 "	2 "	
3) 0,2 "	0,09 "	3 "	2 "	
4) 0,2 "	0,08 "	3 "	2 "	
5) 0,2 "	0,07 "	3 "	2 "	
6) 0,2 "	0,06 "	3 "	2 "	
7) 0,2 "	0,05 "	3 "	2 "	
8) 0,2 "	0,04 "	3 "	2 "	
9) 0,2 "	0,03 "	3 "	2 "	
10) 0,2 "	0,02 "	3 "	2 "	

Die gleiche Pfeife ohne den Zusatz von Glykogen ergab die gleichen Lösungsverhältnisse. Das Glykogen wirkte hier nicht hemmend, da überall Ambozeptoren im Ueberschuß waren.

Ebenso konnte man die die Hämolyse hemmende Wirkung des Glykogens auch bei normalen Seris bedeutend abschwächen, indem man bei ihnen die Ambozeptoren durch Zufügung von inaktivem Serum vermehrte.

A.

Akt. Ziegenserum	Glykogenlösung	Kaninchenblut	Lösung
1) 0,4 ccm	3 Tropfen	2 Tropfen	} schwach
2) 0,3 "	3 "	2 "	
3) 0,2 "	3 "	2 "	
4) 0,1 "	3 "	2 "	
5) 0,09 "	3 "	2 "	} Spur
6) 0,08 "	3 "	2 "	
7) 0,07 "	3 "	2 "	
8) 0,06 "	3 "	2 "	

B.

Akt. Ziegenserum	Inakt. Ziegenserum	Glykogenlösung	Kaninchenblut	Lösung
1) 0,4 ccm	0,6 ccm	3 Tropfen	2 Tropfen	stark
2) 0,3 "	0,6 "	3 "	2 "	} halb
3) 0,2 "	0,6 "	3 "	2 "	
4) 0,1 "	0,6 "	3 "	2 "	
5) 0,09 "	0,6 "	3 "	2 "	
6) 0,08 "	0,6 "	3 "	2 "	} schwach
7) 0,07 "	0,6 "	3 "	2 "	
8) 0,06 "	0,6 "	3 "	2 "	

Dasselbe Experiment wurde auch mit Hundeserum, dem durch inaktiviertes Hundeserum ein Ueberschuß an Ambozeptoren zugesetzt wurde, gemacht. Auch bei dieser natürlichen Hämolyse konnte die Wirkung des Glykogens bedeutend eingeschränkt werden durch Vermehrung der Ambozeptoren.

Bei künstlich erworbener Hämolyse tritt also die hemmende Wirkung des Glykogens ein, wenn die Menge der Ambozeptoren vermindert wird.

Bei der angeborenen Hämolyse kommt keine Hemmung zu stande, wenn die Menge der Ambozeptoren vermehrt wird.

Wir mußten uns nun die Frage vorlegen, kommt es auf die absolute Menge der Ambozeptoren an oder auf das Verhältnis, in welchem ihre Mengen zu den Komplementen stehen. Der folgende Versuch zeigt, daß es auf das Verhältnis der Mengen zueinander ankommt.

Wir stellten die geringste Menge von einem inaktivierten Immuns serum (Ambozeptor) und die geringste Menge von einem normalen indifferenten Serum (Komplement) fest, die zusammen gerade noch ausreichen, um eine Blutart zu lösen. Diese Feststellung wurde mit und ohne Glykogen gemacht. Verwendet wurden inaktiviertes Serum einer mit Ochsenblut vorbehandelten Ziege (Ambozeptor), normales Ziegenserum (Komplement) und gewaschene Ochsenblutkörperchen in 5-proz. Aufschwemmung. Dabei fand sich, daß zur kompletten Lösung von 1 ccm der 5-proz. Blutau Schwemmung ohne Glykogenzusatz gerade ausreichen 0,05 ccm inaktiviertes Immuns serum + 0,25 ccm normales Ziegenserum. Mit Glykogenzusatz verschoben sich die Zahlen um ein geringes; hier waren 0,06 ccm inaktives Immuns serum und 0,25 ccm komplementhaltiges Serum nötig. Bei einer weiteren Verminderung der Ambozeptoren trat die hemmende Wirkung des Glykogens deutlich zu Tage, wie das ja nach den vorhergehenden Versuchen voraussetzen war. Wir gingen nun zu der Ermittlung, ob die absolute Menge des Ambozeptors oder das Verhältnis zur Menge des Komplements das Aus-

schlaggebende sei, von den ermittelten Zahlen 0,05 ccm inaktives Immunsorium und 0,25 ccm Normalserum aus und setzten 4 Versuchsreihen an, die erste mit 0,05 ccm Ambozeptor, die folgenden mit je 0,01 ccm weniger und stufen die Komplementmenge von 0,25 ccm bis auf 0,05 ccm in jeder Reihe ab. Die Ambozeptorenmenge blieb in jeder Reihe unter den einzelnen Reagenzgläsern gleich; die Komplementmenge nahm ab. Das Verhältnis von Ambozeptormenge zur Komplementmenge wurde also durch eine Verminderung der letzteren zu Gunsten der ersteren verschoben, während die absolute Menge Ambozeptor in den Gläsern jeder einzelnen Reihe gleich blieb. Jede Versuchsreihe wurde mit und ohne Glykogen angesetzt. Wenn es nur auf das Verhältnis von Ambozeptor und Komplement ankam, so mußte die hemmende Glykogenwirkung mit der Abnahme der Komplemente, also der Verschiebung zu Gunsten der Ambozeptoren, abnehmen. Dies war auch der Fall, wie die folgenden Tabellen zeigen. Das Verhältnis zwischen Ambozeptorenmenge und Komplementmenge ist entscheidend.

Ia.					
Ambozeptor	Komplement	Glykogenlösung	Blut	Lösung	
1) 0,05 ccm	0,25 ccm	3 Tropfen	1 ccm	}	Spur
2) 0,05 "	0,20 "	3 "	1 "		
3) 0,05 "	0,15 "	3 "	1 "		
4) 0,05 "	0,10 "	3 "	1 "		
5) 0,05 "	0,05 "	3 "	1 "		

Ib.					
Ambozeptor	Komplement	Blut	Lösung		
1) 0,05 ccm	0,25 ccm	1 ccm	}	komplett	
2) 0,05 "	0,20 "	1 "			
3) 0,05 "	0,15 "	1 "			
4) 0,05 "	0,10 "	1 "		fast komplett	
5) 0,05 "	0,05 "	1 "			

IIa.					
Ambozeptor	Komplement	Glykogenlösung	Blut	Lösung	
1) 0,04 ccm	0,25 ccm	3 Tropfen	1 ccm	}	Spur
2) 0,04 "	0,20 "	3 "	1 "		
3) 0,04 "	0,15 "	3 "	1 "		
4) 0,04 "	0,10 "	3 "	1 "		
5) 0,04 "	0,05 "	3 "	1 "		

IIb.					
Ambozeptor	Komplement	Blut	Lösung		
1) 0,04 ccm	0,25 ccm	1 ccm	}	komplett	
2) 0,04 "	0,20 "	1 "			
3) 0,04 "	0,15 "	1 "			
4) 0,04 "	0,10 "	1 "			
5) 0,04 "	0,05 "	1 "		stark	

IIIa.					
Ambozeptor	Komplement	Glykogenlösung	Blut	Lösung	
1) 0,03 ccm	0,25 ccm	3 Tropfen	1 ccm	0	
2) 0,03 "	0,20 "	3 "	1 "	Spur	
3) 0,03 "	0,15 "	3 "	1 "	}	wenig
4) 0,03 "	0,10 "	3 "	1 "		
5) 0,03 "	0,05 "	3 "	1 "		

IIIb.

Ambozeptor	Komplement	Blut	Lösung
1) 0,03 ccm	0,25 ccm	1 ccm	} fast komplett
2) 0,03 "	0,20 "	1 "	
3) 0,03 "	0,15 "	1 "	
4) 0,03 "	0,10 "	1 "	
5) 0,03 "	0,05 "	1 "	

IVa.

Ambozeptor	Komplement	Glykogenlösung	Blut	Lösung
1) 0,02 ccm	0,25 ccm	3 Tropfen	1 ccm	} 0
2) 0,02 "	0,20 "	3 "	1 "	
3) 0,02 "	0,15 "	3 "	1 "	} Spur
4) 0,02 "	0,10 "	3 "	1 "	
5) 0,02 "	0,05 "	3 "	1 "	} wenig

IVb.

Ambozeptor	Komplement	Blut	Lösung
1) 0,02 ccm	0,25 ccm	1 ccm	komplett
2) 0,02 "	0,20 "	1 "	} fast komplett
3) 0,02 "	0,15 "	1 "	
4) 0,02 "	0,10 "	1 "	
5) 0,02 "	0,05 "	1 "	

Nachdem festgestellt war, unter welchen Verhältnissen das Glykogen seine hemmende Wirkung entfaltet, war weiter zu untersuchen, an welcher Stelle es hindernd in die Hämolyse eingreift, ob die Rezeptoren, die Ambozeptoren oder die Komplemente den Angriffspunkt liefern. Die Frage war experimentell leicht zu lösen. Wir brauchten uns bei der Versuchsanordnung nur an die grundlegenden Arbeiten von Ehrlich und Morgenroth zu halten. Wir konnten zu diesen Versuchen nur Normalserum verwenden, da bei ihm nur die Glykogenwirkung sichtbar wird.

Wenn es die Rezeptoren sind, so muß eine Glykogenlösung, die auf die Blutkörperchen einwirkt, diesen die Fähigkeit, Ambozeptoren zu verankern, nehmen. Dies ist nicht der Fall. Meerschweinchenblut wurde mit Glykogenlösung eine Stunde in den Brutschrank gebracht, dann abzentrifugiert und mehrfach mit Kochsalzlösung gewaschen. Hierauf wurde Ochsen Serum zugesetzt, und die Lösung trat ebenso stark auf wie ohne Glykogenzusatz. Das Blut hatte in beiden Versuchen in gleicher Weise mit Kochsalzlösung im Brutschrank gestanden und war ebenso oft gewaschen und zentrifugiert worden. Das gleiche Resultat ergab ein genau abgestufter Versuch mit Ziegenblut und Kaninchen Serum. Die Rezeptoren werden also durch das Glykogen nicht verändert.

Ob die Ambozeptoren vom Glykogen beeinflusst werden, ist ebenfalls leicht zu entscheiden. Bringt man inaktiviertes normales Serum, das mit Glykogen versetzt ist, mit den passenden Erythrocyten zusammen, so verankern sich die Ambozeptoren an die Rezeptoren. Die abzentrifugierten roten Blutkörperchen lösen sich dann, wenn man sie mit einem komplementhaltigen Serum zusammenbringt. Durch Erwärmen inaktiviertes Hundeserum wurde in abgestuften Mengen mit je 3 Tropfen der Glykogenlösung eine Stunde in den Brutschrank gebracht. Darauf Zusatz von je 2 Tropfen defibrinierten Kaninchenblutes und nochmals eine halbe Stunde Brutschrank. Danach Abzentrifugieren und Waschen der Erythrocyten mit NaCl-Lösung. Wenn man nun Pferdeserum, welches die nötigen Komplemente enthält, auf die roten Blutkörperchen

brachte, so mußte es sich entscheiden, ob die Ambozeptoren trotz der Gegenwart von Glykogen an die Rezeptoren herangegangen waren. Dies war der Fall. Die Lösung trat genau in derselben Stärke auf bei den mit Glykogenlösung zusammengebrachten Blutkörperchen, wie bei den zur Kontrolle dienenden, die ohne Glykogen denselben Prozessen unterworfen wurden.

Das völlig gleiche Resultat ergab ein ebenso angestellter Versuch mit inaktiviertem Hundeserum und Meerschweinchenblut, wobei die Komplemente von Meerschweinchenserum geliefert wurden. Die Ambozeptoren wurden durch Glykogen an keiner Seite angegriffen.

Da weder die Rezeptoren noch die Ambozeptoren der natürlichen Hämolyse von dem Glykogen beeinflußt werden, so kommen die Komplemente allein noch in Frage. Das Experiment bestätigte dies auch. Läßt man auf Blutkörperchen, welche mit dem Ambozeptor beladen sind, geeignetes komplementhaltiges Serum einwirken, so tritt Lösung ein. Dieselbe wird aber abgeschwächt, wenn das komplementhaltige Serum vorher mit Glykogen zusammengebracht wird. Die Verankerung der Ambozeptoren kann mit einem durch Erwärmen inaktivierten Serum geschehen, dessen Komplemente vernichtet sind oder durch die Einwirkung eines normalen Serums in der Kälte, da die Komplemente ja bei niedriger Temperatur nicht an die Ambozeptoren herangehen. Sachs¹⁾ hat besonders darauf aufmerksam gemacht, daß man bei der Inaktivierung eines natürlich hämolytischen Serums durch Wärme nur dann auf ein Gelingen der Reaktivierung durch komplementhaltiges Serum rechnen kann, wenn man mit großer Vorsicht nur die Temperatur einwirken läßt, die gerade zur Vernichtung der Komplemente ausreicht. Ehe ich diese Vorsichtsmaßregel kennen gelernt hatte, mißglückten mir eine ganze Reihe von Reaktivierungsversuchen bei dem natürlich hämolytisch wirkenden Serum. Ich benutzte stets 2 ccm Serum zum Reaktivieren.

Die Versuche, welche den Einfluß des Glykogens auf das Komplement der natürlichen Hämolyse zeigen, sind die folgenden.

Durch 49° Wärme inaktiviertes Hundeserum in abgestuften Mengen wurde mit je 2 Tropfen Kaninchenblut zusammengebracht, und nachdem die Reagenzgläser eine Stunde bei 37° gestanden hatten, abzentrifugiert. Auf die jetzt mit Ambozeptoren beladenen Kaninchenblutkörperchen wurden je 2 ccm Pferdeserum gebracht, die vorher mit je 3 Tropfen Glykogenlösung eine Stunde im Brutschrank gestanden hatten. Eine Reihe von Reagenzgläsern wurde zur Kontrolle ebenso ohne Glykogenzusatz angesetzt. Die hierunter stehende Tabelle zeigt die starke Abschwächung der Komplemente.

Inakt. Hundeserum	Kaninchenblut	Lösung
A. Ohne Glykogenzusatz.		
1) 0,3 ccm	2 Tropfen	} stark
2) 0,2 "	2 "	
3) 0,1 "	2 "	
4) 0,08 "	2 "	
5) 0,06 "	2 "	
6) 0,04 "	2 "	

1) Sachs, H., Gibt es einheitliche Alexinwirkungen? (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 9 u. 10. p. 217.)

	Inakt. Hundeserum	Kaninchenblut		Lösung
B. Mit Glykogenzusatz.				
1)	0,3 ccm	2 Tropfen	1 Stunde bei 37°, dann abzentrifugiert. Zusatz von je 2 ccm	stark
2)	0,2 "	2 "	Pferdeserum, das 1 Stunde mit	Spur
3)	0,1 "	2 "	je 3 Tropfen Glykogenlösung	} 0
4)	0,08 "	2 "	im Brutschrank gestanden.	
5)	0,06 "	2 "		
6)	0,04 "	2 "		

Bei dreimaliger Wiederholung ergab der Versuch stets dasselbe Resultat. In gleichem Sinne fiel ein ebenso angestelltes Experiment mit Hundeserum und Kaninchenblut aus.

Eine Abschwächung der Wirkung der Komplemente durch Glykogen zeigte sich ebenfalls, wenn die Verankerung der Ambozeptoren in der Kälte stattgefunden hatte. Kaninchenserum blieb mit Ziegenblut in 2 abgestuften Pfeifen 18 Stunden im Eisschrank. Dann wurden die roten Blutkörperchen in der Kälte abzentrifugiert und mit Kochsalzlösung gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das durch das Zentrifugieren von den Erythrocyten und den daran haftenden Ambozeptoren befreite Serum wurde in einer abgestuften Reihe mit und in einer anderen gleichen Reihe ohne Glykogen eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Brachte man nun das Serum, das die Komplemente ja noch enthielt, wieder mit den mit Ambozeptoren beladenen Blutkörperchen in der Wärme zusammen, so mußte sich in der einen Reihe zeigen, ob das Glykogen auf die Komplemente eingewirkt hatte. Die folgende Tabelle zeigt diese Einwirkung deutlich.

	Kaninchenserum	Ziegenblut		Lösung
A. ohne Glykogenzusatz.				
1.	0,5 ccm	2 Tropfen	18 Std. Eisschrank. Zentrifugierte, gewaschene Blutkörperchen. Abzentrifugiertes Serum, das 1 Std. bei 37° gestanden. Beides wieder zusammengebracht.	} stark
2.	0,4 "	2 "		
3.	0,3 "	2 "		} schwach
4.	0,2 "	2 "		
5.	0,1 "	2 "		
B. mit Glykogenzusatz.				
1.	0,5 ccm	2 Tropfen	18 Std. Eisschrank. Abzentrifugierte u. gewaschene Blutkörperchen. Abzentrifugiertes Serum, das 1 Std. mit je 3 Tropfen Glykogenlösung bei 37° gestanden. Beides wieder zusammengebracht.	} stark
2.	0,4 "	2 "		
3.	0,3 "	2 "		} Spur
4.	0,2 "	2 "		
5.	0,1 "	2 "		

Ein Einfluß auf die Wirksamkeit der Komplemente ist durch diese Versuche sichergestellt. Es geht aus ihnen aber auch hervor, daß das Komplement durch das Glykogen nicht vollständig vernichtet wird; denn trotz des Zusatzes von Glykogen tritt eine Lösung ein in den Gläsern, welche die größte Menge inaktivierten Serums, d. h. die meisten Ambozeptoren enthalten. Die Einwirkung auf die Komplemente wird wieder beeinflußt durch die Anwesenheit von Ambozeptoren. Im Vorhergehenden habe ich schon darauf hingewiesen, daß eine Vermehrung der Ambozeptoren die hemmende Wirkung des Glykogens aufhebt. Durch diese 2 Tatsachen, einerseits die Einwirkung auf die Komplemente, andererseits die Aufhebung dieser Einwirkung durch verhältnismäßig große Mengen von Ambozeptoren, werden wir zu

der Annahme gedrängt, daß zwischen Komplement und Glykogen eine Einwirkung stattfindet, welche durch verhältnismäßig kleine Mengen Ambozeptor nicht in merkbarer Weise beeinflußt wird, die aber durch eine verhältnismäßig große Menge beeinflußt wird.

Der Unterschied der Wirkung des Glykogen bei Normal- und bei Immunsorum findet nach unseren Versuchen seine Erklärung in dem Einfluß, den das verschiedene Mengenverhältnis zwischen Komplementen und Ambozeptoren ausübt. Wie schon oben angeführt wurde, wirkt Glykogen nicht hemmend, wenn wir Komplement, Ambozeptor, rote Blutkörperchen und Glykogen gleichzeitig zusammenbringen. Die Lösung tritt gleich schnell und gleich energisch auf mit oder ohne Glykogenzusatz. Zur Erklärung läßt sich die Tatsache heranziehen, daß die Ambozeptoren eine größere Affinität zu den Komplementen erhalten, wenn sie an die Rezeptoren der Blutkörperchen herangetreten sind¹⁾.

Die Verwandtschaft der Verbindung (Ambozeptor—Rezeptor) zu den Komplementen ist so viel stärker, als die zwischen Komplement und Glykogen, daß die Komplemente bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glykogen und an Rezeptoren verankerten Ambozeptoren zunächst an die letzteren herangehen.

Die Einwirkung des Glykogens auf die natürliche Hämolyse ist auch bei dem lebenden Tier zu beobachten. Einem Kaninchen injizierte ich innerhalb 24 Stunden 3mal je 1 g Glykogen in die Ohrvene. Das Serum, welches dem Tier eine halbe Stunde nach der letzten Einspritzung entnommen wurde, hatte fast ganz seine vorher bedeutende Lösungskraft gegenüber Ziegenblut verloren. Am 2., 4. und 7. Tage wurden weitere Proben entnommen, und es ergab sich, daß die hämolytische Wirkung ganz allmählich zurückkehrte und am 7. Tage wieder so stark war, als vorher. Ob sich die Komplemente, die durch das Glykogen gebunden waren, ersetzt hatten, oder ob das Glykogen allmählich aus der Verbindung gelöst worden war, kann ich nicht entscheiden. Die Einwirkung des Glykogens in vivo war zunächst eine so vollständige, daß ein Zusatz von Glykogenlösung zu dem entnommenen Serum keinen weiteren Unterschied machte.

Da das Glykogen sich in den verschiedensten Geweben des Körpers, auch im Blute, findet²⁾, so darf man wohl annehmen, daß es im Körper mit Komplementen auch normalerweise zusammenkommt und eine Verbindung eingeht. Die Eigentümlichkeit dieser Verbindung, nur unter bestimmten Mengenverhältnissen durch die Ambozeptoren beeinflußt zu werden, übt möglicherweise häufig im Serum eine Wirkung aus und kann vielleicht mitherangezogen werden bei der Beurteilung der von Morgenroth und Sachs¹⁾ veröffentlichten Tatsache, „daß bei Gegenwart größerer Ambozeptormenge zur Hämolyse kleinere Komplementdosen genügen“.

1) v. Dungern, l. c. p. 35. „Man kann . . . mit Ehrlich annehmen, daß die chemische Affinität zwischen Immunkörper und Komplement an und für sich sehr gering ist, durch die Verbindung des Immunkörpers mit der Zelle aber eine beträchtliche Verstärkung erfährt.“

2) Eine Zusammenstellung findet sich bei E. Pflüger, Glykogen. Kapitel III. p. 126. Pflügers Archiv. Bd. CVI.

Meine Versuche beschränken sich auf die Einwirkung des Glykogens auf die Hämolyse beim Serum. Ob es auch bei anderen hämolytischen oder bakteriolytischen Substanzen eine Einwirkung ausübt, müssen weitere Versuche ergeben.

Ein Versuch mit Keuzspinnengift, dessen blutlösende Wirkung durch Kobert²⁾ und Sachs³⁾ bearbeitet worden ist, fiel negativ aus. Das Glykogen hat gar keinen Einfluß. Kaninchenblut wurde in gleicher Weise mit und ohne Glykogenzusatz von dem Kreuzspinnengift gelöst. Das war auch von vornherein anzunehmen, da wir es in diesem Fall mit ganz anders zusammengesetztem Gifte zu tun haben, als bei den Hämolytinen.

Außer dem Glykogen untersuchten wir auf hemmende Wirkung hin auch noch andere Stärkearten, nämlich Reisstärke, Inulin und Lichenin. Von diesen übten Reisstärke und Lichenin keine merkbare Wirkung aus, Inulin hemmte die Hämolyse stark, sowohl bei normalem wie bei Immuserum. Von den Gummiarten wurden Gummi arabicum und Dextrin geprüft. Beide zeigten sich wirkungslos. Die chemische Zusammensetzung aller dieser Substanzen ist der des Glykogen ähnlich ($C_6H_{10}O_5$)_n. Wir prüften auch die Cellulose ($C_{12}H_{20}O_{10}$)_n ohne eine Hemmung zu erzielen. Ebenso wirkungslos erwies sich Chondrin. Ueber die hemmende Wirkung des Carrageenmooses erschien, während wir mit der vorliegenden Arbeit beschäftigt waren, eine Publikation von v. Lingelsheim⁴⁾. Er fand eine hemmende Wirkung des Carrageenmooses auf die hämolytische Kraft von Rinderserum gegen Meerschweinchenblut und Schweineserum gegen Schafblut, also von Normalserumarten. Diese Einwirkung konnten wir bei Kaninchen serum gegenüber Ziegenblut bestätigen; bei Prüfung gegenüber einem Immuserum (Ochsenkaninchen), über welche sich kein Versuch in der genannten Publikation vorfindet, fanden wir die Wirkung sehr viel weniger deutlich. v. Lingelsheim kommt zu dem Schlusse, daß der Schleim des Carrageenmooses Ambozeptoren und Komplemente ausfällt, die letzteren aber nicht vollständig.

Pepton (Witte), das wir auch auf seine Einwirkung bei Hämolyse prüften, hemmte deutlich bei Normalserum, aber nur schwach bei Immuserum.

Ob auch bei diesen Substanzen, soweit sie eine dem Glykogen ähnliche Wirkung ausüben, ein ähnlicher Prozeß anzunehmen ist, und es auch auf einen Unterschied des Mengenverhältnisses zwischen Komplement und Ambozeptor ankommt, könnte erst nach eingehenden Versuchen entschieden werden. Eine Generalisierung ist bei so komplizierten Vorgängen jedenfalls nicht erlaubt.

Das Resultat der vorhergehenden Arbeit ist, kurz zusammengefaßt, das folgende: Das Glykogen übt einen Einfluß auf die Komplemente aus und kann dadurch hemmend auf hämolytische Vorgänge einwirken. Diese Einwirkung tritt nur

1) Morgenroth und Sachs, Ueber die quantitativen Beziehungen von Ambozeptor, Komplement und Antikomplement. (Berl. klin. Wochenschr. 1902. No. 35.)

2) Kobert, Beiträge zur Kenntnis der Giftspinnen. Stuttgart 1901.

3) Sachs, H., Zur Kenntnis des Kreuzspinnengiftes. (Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. von Hofmeister. Bd. II. p. 125.)

4) v. Lingelsheim, Ausfällung bakterizider und globulizider Blutfermente durch Pflanzenschleim. (Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten. Bd. XLII. p. 308.)

dann zu Tage, wenn in einem Serum im Verhältnis zur Menge der Komplemente wenig Ambozeptoren vorhanden sind. Eine Verschiebung des Verhältnisses der Mengen zu Gunsten der Ambozeptoren hebt die hemmende Wirkung des Glykogens immer mehr und schließlich ganz auf. Aus diesem Grunde wirkt das Glykogen hemmend bei Normalserum, nicht hemmend bei Immunerum. Denn in dem ersteren sind weniger Ambozeptoren als in dem letzteren im Verhältnis zu der Komplementmenge.

Ein Normalserum läßt sich von einem Immunerum durch dies verschiedene Verhalten gegenüber dem Glykogen unterscheiden.

Die Wirkung des Glykogens ist in weiten Grenzen unabhängig von der zugesetzten Menge. Sie tritt nur ein, wenn das Glykogen dem Serum zugesetzt wird, ehe die passenden Blutkörperchen zugefügt sind. Die Verbindung Rezeptor und Ambozeptor wirkt so stark anziehend auf das Komplement, daß bei gleichzeitigem Zusammenbringen von Komplement, Ambozeptor, roten Blutkörperchen und Glykogen eine Verbindung von Komplement und Glykogen nicht stattfindet oder wenigstens nicht bemerkbar wird.

Nachdruck verboten.

Ueber die Bindung des Bakteriohämolysins an die roten Blutkörperchen.

[Aus dem staatl. sero-therapeut. Institute in Wien, Vorstand Prof. Paltauf.]

Von Dr. Richard Volk.

Mit 1 Kurve.

Mit Versuchen über die Vielheit der Lysine im Staphylolysin beschäftigt, mußte ich zunächst die Bindungsverhältnisse dieses Giftes an die roten Blutkörperchen etwas genauer studieren.

Durch die Untersuchungen von Schur ist die wichtige Tatsache festgestellt worden, daß sich der Wirkungswert verschiedener Lysinmengen hauptsächlich durch die Reaktionsgeschwindigkeit kundgibt, mit der die Lyse erfolgt, eine Tatsache, die besonders bei höheren Lysindosen auffallen mußte, da auch bei diesen sich der beschleunigende Einfluß der größeren Menge geltend machen konnte; es gelangt offenbar hierbei auch die größere Lysinmenge zur Wirkung.

Ist nun Ehrlichs Ansicht richtig, daß nur die gebundene Lysinmenge einwirken könne — und dieses Gesetz ist bisher noch unangefochten geblieben — so mußte man zur Erklärung der obigen Befunde a priori annehmen, daß von der größeren Lysinmenge auch mehr gebunden wird. Ehrlich und Morgenroth konnten nun, angeregt durch einen Versuch Bordets, konstatieren, daß bei Einwirkung des Immunhämolysins auf rote Blutkörperchen große Multipla der einfach

lösenden Dosis des Zwischenkörpers verankert werden können. Diese Verhältnisse bei der Bindung der Bakteriohämolysine genauer kennen zu lernen, ist der Zweck meiner Untersuchungen.

In Kürze sei die Methodik eines solchen Bindungsversuches angeführt. Ich benützte vorwiegend das Staphylolysin, da es nächst dem Tetanolylin wohl das beststudierte Bakteriohämolysin ist und vor dem letzteren den Vorzug hat, daß es, mit Karbol-Glycerin versetzt, lange Zeit seinen Titre unverändert beibehält. Nebenbei arbeitete ich auch mit dem Lysin des *Vibrio Nasig*, das auch gute Lösungswerte gibt, sich aber doch viel rascher abbaut als das Staphylolysin.

Es wurden also zu einer bestimmten Blutkörperchenmenge steigende Dosen Lysins zugesetzt, das Ganze stets auf die gleiche Flüssigkeitsmenge durch 0,85 Proz. NaCl-Lösung ergänzt, 2 Stunden bei 37° belassen und dann auf die Lösungskraft ausgewertet.

Zur Bestimmung der Lysineinheit bediente ich mich in Anlehnung an *Madsen-Schur* der kolorimetrischen Methode, nur ging ich bei der Grenzbestimmung nicht so weit hinunter, wie es letzterer für wünschenswert hält, sondern nahm eine Lösungsgrenze, die etwa der Ehrlichschen Marke „rot“ entspricht (was deshalb geschah, damit die Eigenfärbung des in hohen Konzentrationen zugegebenen Lysins nach Einwirkung auf Blutkörperchen zwecks Ermittlung der übrig gebliebenen Lysinmenge weniger störend wirke). Zur Kontrolle bestimmte ich übrigens auch den Hb-Gehalt in einem oder dem anderen Versuche nach *Fleischl*; dies jedoch konsequent durchzuführen, wäre bei der großen Anzahl von Röhrcchen zu umständlich gewesen. Auf diese Marke wertete ich nun jedes Lysin aus.

Meinen ursprünglichen Plan, die von *Kraus und Ludwig* beschriebene Agglutination der roten Blutkörperchen als Indikator anzunehmen, mußte ich bald fallen lassen, nachdem schon die geringste Störung in der Isotonie zur Agglutination führte, so daß die roten Blutkörperchen der Kontrolle auch nicht selten agglutiniert waren. Dagegen war es möglich, die Agglutination als unterstützendes Moment zu gebrauchen, da bei meiner Marke „rot“ die Blutkörperchen am Boden des Reagenzglases eine „farblose“ agglutinierte Masse bildeten. Es sei bemerkt, daß das Lysin für jeden Versuch besonders ausgewertet und der ganze Versuch mit einerlei Blutkörperchen angestellt wurde.

Die Berechnung geschah nun in der Weise, daß mir die Differenz der zugegebenen und übrig gebliebenen Lysineinheiten, selbstverständlich stets auf dieselbe Flüssigkeitsmenge berechnet, die absorbierte absolute Lysinmenge angab, während die relative durch den Quotienten aus absoluter absorbierter und zugegebener Lysinmenge bestimmt wird; ich gebe die letztere in Prozenten an.

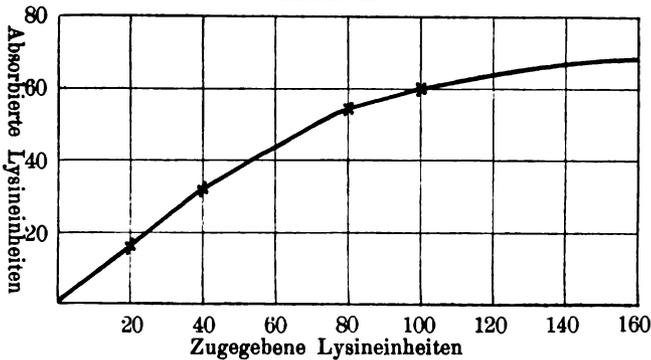
Der Methode haften ohne Zweifel manche Fehlerquellen an, die sich ja zum Teil vielleicht sogar noch korrigieren ließen, so z. B. wenn man statt durch Blutkörperchen durch die Stromata derselben binden ließe, da ja an diesen die bindende Substanz haften dürfte, was übrigens noch zu zeigen wäre. — Ich suchte eine Korrektur der etwaigen Fehler durch möglichst zahlreiche Kontrolluntersuchungen zu erzielen.

Tabelle I gibt nun das Resultat eines solchen Versuches bei verschiedenen Lysin- und Blutmengen; die Kurve (Tabelle II) ist nach Ia gezeichnet.

Tabelle I.
Wert des verwendeten Lysins = 100 Lo.

	Zugegebene Lysinmenge in ccm	Zugegebene Lysinmenge in Einheiten	Restliche Lysinmenge in Einheiten	Absorbierte Lysinmenge in Einheiten	Absorbierte Lysinmenge in Proz.
5 Proz. Kan.-Bl.					
a.	0,2	20	5	15	75
	0,4	40	8,5	31,7	79
	0,8	80	25	55	69
	1,0	100	ca. 40	ca. 60	60
	1,6	160	83,3	76,7	48
10 Proz. Kan.-Bl.					
b.	0,2	20	0	20	100
	0,4	40	5	35	88
	0,8	80	12,5	67,5	84
	1,0	100	25	75	75
	1,6	160	62,5	97,5	61
20 Proz. Kan.-Bl.					
c.	0,2	20	0	20	100
	0,4	40	0	40	100
	0,8	80	5	75	94
	1,0	100	6,3	93,7	93,7
	1,6	160	25	135	84

Tabelle II.



Die vorstehende Tabelle zeigt uns zunächst, daß nach Einwirkung des Lysins auf die roten Blutkörperchen ein Verlust an Lysinwert entsteht, daß also Lysin gebunden wird. Doch ist die Menge des gebundenen Lysins nicht stets die gleiche, sondern sie nimmt mit wachsender zugegebener Lysinmenge bei gleichbleibender Blutkörperchenzahl zu und zwar in einer Weise, die eine Gesetzmäßigkeit vorläufig nicht erkennen läßt. Aus der letzten Rubrik ersehen wir andererseits, daß mit zunehmender Lysinmenge die relative Absorptionsgröße abnimmt, so daß wir das Absorptionsgesetz des Staphylolytins so formulieren können: bei gleichbleibender Menge der bindenden Substanz wächst die absolute Absorptionsgröße mit der zugegebenen Lysinmenge, während die relative fällt, ein Verhalten, das in bester Uebereinstimmung mit den Bindungsgesetzen der Immunkörper an die entsprechenden Receptoren steht. Daraus folgt aber wieder, daß die absolute Absorptionsgröße anfangs rasch in die Höhe steigt, später jedoch die Zunahme eine immer geringere wird.

Um Fehler auszuschließen, modifizierte ich in einigen Versuchen die Anordnung so, daß ich zu den betreffenden Lysinblutkörperchenverdünnungen entsprechende NaCl-Lysinverdünnungen auswertete, mit ähnlichem Resultate.

Die roten Blutkörperchen verschiedener Kaninchen binden bei gleicher Verdünnung selbst vom selben Lysin nicht stets gleich viel, sondern oft erheblich weniger, als in obiger Tabelle ersichtlich, was ich nicht allein auf eine geringere Blutkörperchenzahl, sondern insbesondere auf eine Variabilität in der Menge der bindenden Substanz des einzelnen Blutkörperchens zurückführen möchte.

Die Bindung erfolgt auch bei niedriger Temperatur, nur erheblich langsamer als bei 37°.

Mehrere Versuche, in der Absicht ausgeführt, Unterschiede in der Bindung zu bekommen, je nachdem ich das Lysin auf einmal oder dieselbe Menge in Portionen zugab, fielen so aus, daß ich entweder gar keine oder nur so geringe Unterschiede bekam, daß ich sie vorläufig kaum verwerten kann.

Zum Vergleich wurde das Lysin des *Vibrio Nasig* betreffs seiner Bindung herangezogen, es gab ähnliche Resultate, nur scheinen noch größere Multipla als vom Staphylolysin gebunden werden zu können. Ich hatte zufällig je ein *Vibrio*- und Staphylolysin von derselben Größe der einfach lösenden Dose. Die Tabelle III bestätigt meine oben ausgesprochene Ansicht, indem Staphylolysin bereits Reste gibt in Verdünnungen, in welchen das *Vibriolysin* noch vollständig absorbiert wird, trotzdem der Versuch mit denselben Kaninchenblutkörperchen aufgestellt wurde.

Tabelle III.

	Zugegebene Lysinmenge in ccm	Zugegebene Lysinmenge in Einheiten	Restliche Lysinmenge in Einheiten	Absorbierte Lysinmenge in Einheiten	Lysinmenge in Proz.
Staphy- lolysin 50 L. E.	0,2	10	0	10	100 Proz.
	0,4	20	5	15	75 "
	0,8	40	12,5	17,5	68 "
Vibrio- lysin 50 L. E.	0,2	10	0	10	} 100 Proz.
	0,4	20	0	20	
	0,8	40	0	40	
	1,0	50	0 (?)	50	

Das den roten Blutkörperchen anhaftende Serum spielt in den meisten Fällen für die Bindung gar keine Rolle, indem gewaschene und ungewaschene rote Blutkörperchen dieselben Bindungswerte geben, ein Befund, der mit der von Neisser-Wechsberg gefundenen Tatsache, daß das normale Kaninchenserum gewöhnlich kein Antilysin enthält, in vollem Einklang steht, nur in einem Falle konnte ich eine wesentliche Differenz in der Bindung zu Ungunsten der gewaschenen Blutkörperchen finden, die ich auf ein vorhandenes Antilysin zurückführen möchte, leider hatte ich kein Serum mehr, um den direkten Beweis zu führen.

Von vornherein sollte man wohl glauben, daß Multipla des Lysins durch entsprechende Multipla von Blut abgesättigt werden. Tabelle III zeigt aber, daß größere Blutmengen zwar mehr, doch bei weitem nicht so viel, als gefordert würde, binden. Ob dies nur an rein äußeren Dingen liegt, insbesondere daran, daß das Lysin mit den Blutkörperchen

nicht so gut in Kontakt kommen könnte (infolge der Agglutination etc.), das müssen erst weitere Versuche lehren.

Es ist bekannt, daß zwischen Zugabe des Lysins und Lösung eine gewisse Latenzzeit liegt, die um so geringer wird, je größer die zugegebene Lysinmenge ist. Ganz ähnlich verhält es sich mit der Geschwindigkeit der Bindung, wie ein einfacher Versuch lehrt: Es werden zu einer bestimmten Blutkörperchenmenge die einfach und die 5-fach lösende Dosis Staphylolysin zugegeben und nach verschiedenen Zeiten zentrifugiert, die darüberstehende Flüssigkeit abgehoben, der Rest auf dieselbe Menge aufgefüllt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Sieht man die gelöste Blutmenge, ausgedrückt in Proz. Hb nach Fleischl, als Indikator für die Menge des gebundenen Lysins an, so lehrt Tabelle IV, daß um entsprechenden Hb-Gehalt zu bekommen, die Latenzzeit um so größer ist, je geringer die zugegebene Lysinmenge.

Tabelle IV.

Lysinmenge	0'	5'	15'	30'	Kontrolle ¹⁾
0,02	180	210	275	290	350
0,1	425	450	460		475

Ein erhöhtes Interesse gewannen die obigen Befunde im Zusammenhange mit den Ergebnissen Schurs, die er bei den Studien über die Wirkungsweise des Staphylolytins gewann. Er fand, daß um so mehr Hb bei gleicher Menge Toxin gelöst wurde, je mehr Blut zur Verfügung war. Die Menge des nach einer bestimmten Zeit gelösten Hb wächst bis zu einem bestimmten Punkte mit der Blutkonzentration ziemlich rasch, um dann allmählich wieder abzusinken.

Andererseits wird aus gleichen Blutquantitäten um so mehr Hb gelöst, je größer die angewendete Toxinmenge ist, wobei jedoch Lysinmengen und gelöstes Hb nicht einfach nach Multipla geht, sondern es wird pro Toxineinheit um so weniger gelöst, je mehr Toxin zugegeben wird.

Vergleicht man die Resultate dieser Untersuchungen mit den unserigen, so ist eine Abhängigkeit zwischen Bindung und Lösung in die Augen springend. Der Gedanke liegt nicht fern, die eigentümliche Wirkungsweise des Staphylolytins mit seiner Bindung in Zusammenhang zu bringen. Es werden dadurch die Ergebnisse aus Schurs Arbeit verständlich, da wir zu ihrer Erklärung von der Annahme, daß nur gebundenes Lysin wirkt, nicht abgehen müssen.

Pfeiffer und Friedberger konnten in einer kürzlich erschienenen Arbeit einen Verbrauch von Choleraimmunkörpern bei Auflösung von abgetöteten Choleravibrionen im Meerschweinchenperitoneum nicht konstatieren, so daß sie geneigt waren, den bakteriolytischen Prozeß als einen katalytischen aufzufassen, wie dies Schur für die Bakteriohämolytine getan hat. Bei der Bakteriohämolyse wird ein Teil des Lysins so gebunden, daß er für die weitere Reaktion nicht in Frage kommt. Gegen die Fermentnatur spricht dies natürlich gar nicht, da wir ja heute schon wissen, daß Fermente durch die Körper, auf welche sie wirken, gebunden werden, und zwar sogar in großen Mengen, ohne daß wir jedoch bisher die näheren Details der Bindung kennen würden.

1) Als Kontrolle wurde ein Röhrchen, ohne es abzuheben, 24 Stunden stehen gelassen und der Hb-Gehalt nach Fleischl bestimmt.

Immer wieder taucht zum Schlusse die Frage auf: Wie ist diese Bindung zu erklären, was ist das ganze für ein Prozeß? Ehrlich mußte, ausgehend von seiner Seitenkettentheorie, die Bindung für einen chemischen Vorgang halten und erklärte die „Uebersättigung“ dadurch, daß jede Zelle viele Rezeptoren habe, die je nach der zugegebenen Toxinmenge in verschiedenem Grade besetzt werden.

Eisenberg und ich konnten ähnliche Verhältnisse bei der Bindung von Agglutinin an Typhus- und Cholerakulturen konstatieren; wir sprachen damals ebenfalls von einer Uebersättigung und glaubten „eine absolut konstante Kapazität der agglutinierbaren Substanz wenigstens für Immunagglutinine negieren zu müssen.“ Wassermann kam in einer bald darauf erschienenen Arbeit zu denselben Bindungsgesetzen betreffs der Agglutinine.

Bald erkannte Eisenberg dieselben Gesetze auch für die Präzipitationsvorgänge von Eiereiweiß durch Immunserum als gültig, erklärt jedoch dieselben als Konzentrationswirkungen. In einem Autoreferat spricht er ausdrücklich von einem Gleichgewichtszustand der beiden reagierenden Substanzen, der durch frischen Zusatz einer von beiden Komponenten gestört werden kann, wodurch die Reaktion wieder in Gang gebracht wird.

Ganz ähnliche Ansichten finden wir bei Linossier und Lemoine, die von einer rupture d'équilibre bei Zusatz frischen Präzipitins oder präzipitabler Substanz sprechen. Müller schließt sich auf Grund von Versuchen über die Bindung des Laktoserums an das Kasein den Ansichten Eisenbergs vollständig an.

Diese Auffassung würde auch für die Bakteriohämolysine anwendbar sein, und es könnten demnach jene chemisch-physikalischen Gesetze zur Geltung kommen, die die Gleichgewichtszustände in Lösungen und ihre Störungen beherrschen. Daß es sich hierbei um einen echten Gleichgewichtszustand reversibler Prozesse handelt, haben für die Agglutinine Landsteiner und Jagič in ihrer Arbeit gezeigt. Das Gesetz der Massenwirkung, wonach die chemische Wirkung jedes Stoffes seiner wirksamen Masse oder Konzentration proportional ist, ermöglicht uns das Verständnis für die Bindungsverhältnisse.

Zusammenfassung:

- 1) Die Bindungsgröße der Bakteriohämolysine ist abhängig sowohl von der Menge des Lysins als auch von der der Blutkörperchen, wobei die absolute Höhe des gebundenen Lysins mit der Zunahme der beiden Faktoren wächst, während die relative abnimmt.
- 2) Die Größe der Bindung wechselt sowohl je nach dem Individuum derselben Spezies, als auch beim selben Individuum nach der Art des Lysins.
- 3) Die Temperatur hat einen Einfluß auf die Schnelligkeit der Bindung.
- 4) Die Reaktionsgeschwindigkeit wächst mit der Menge des zugegebenen Lysins.
- 5) Das Gesetz der Massenwirkung erklärt uns die Eigentümlichkeiten der Bindungsverhältnisse.

Literatur.

- Ehrlich u. Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1901. No. 9, 21, 22.
 Eisenberg, Ph., Bull. de l'acad. d. scienc. de Cracovie. 1902. Mai.
 —, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXI. 1902.
 Eisenberg, Ph. u. Volk, R., Zeitschr. f. Hyg. Bd. XL. 1902.
 Landsteiner u. Jagić, Münch. med. Wochenschr. 1903.
 Madsen, Th., Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXII.
 Michaelis u. Oppenheimer, Arch. f. Anat. u. Phys. 1902. Suppl.-Bd.
 Müller, P. Th., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXIV. 1903. No. 1.
 Linossier et Lemoine, Compt. rend. de la soc. de biol. 1902. p. 85.
 Neisser u. Wechsberg, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XXXVI. 1901.
 Ostwald, Analytische Chemie. 1897.
 Pfeiffer u. Friedberger, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. XXXIV. No. 1.
 Sachs, H., Lubarsch-Ostertag Ergebnisse. 1902.
 Schur, H., Hofmeisters Beiträge z. chem. Phys. u. Path. Bd. III. Heft 1—3.
 Wassermann, Samml. klin. Vortr. No. 331.
 —, Zeitschr. f. Hyg. Bd. XLII. 1903.

*Nachdruck verboten.***Zur Lehre von den antitoxischen Seris.**

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien (Vorstand:
 Prof. Dr. R. Paltauf).]

Von Dr. **Friedrich Wechsberg**, Assist. a. d. I. med. Universitätsklinik.

Durch die zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre auf dem Gebiete der Immunitätslehre haben wir eine große Reihe von wirksamen Substanzen kennen gelernt, die entweder erst nach Immunisierung entstehen oder bereits vorgebildet in dem Serum der verschiedensten Tiere enthalten sind. Bei der Kompliziertheit der vorliegenden Verhältnisse, die namentlich dadurch begründet erscheinen, daß wir es ja nicht mit reinen Lösungen der betreffenden Körper zu tun haben, kann es nicht wunder nehmen, wenn trotz reicher Arbeit selbst in grundlegenden Fragen noch keine Einigung erzielt werden konnte. Relativ rasch wurde es klar, daß man die verschiedenen Wirkungen der normalen Sera, wie Bakteriolyse, Agglutination, Präzipitation, antitoxische Wirkungen etc., wohl untereinander verschiedenen Substanzen zuschreiben muß.

Weit schwieriger gestaltete sich schon die Beantwortung der Frage, ob jeder einzelne dieser Körper als ein einheitlicher gedacht werden soll, d. h. ob z. B. die Agglutination der verschiedenen Bakterien durch ein normales Serum auf ein einheitliches Agglutinin zurückzuführen sei oder ob für jedes Bakterium wieder ein besonderes (spezifisches) Agglutinin in Frage komme.

Während der unitarische Standpunkt besonders von französischer Seite (Bordet), ferner von Buchner, Gruber etc. in einer großen Anzahl von Arbeiten betont und stets aufs neue vertreten wurde, waren es namentlich Ehrlich und seine Schüler, die die Ansicht von einer Vielheit der verschiedenen wirksamen Substanzen verfochten. Soweit wir den heutigen Stand der Frage übersehen können, scheint sich die weitaus überwiegende Zahl der Forscher auf Ehrlichs Seite gestellt zu haben, glaubt ja sogar Metschnikoff auf Grund seiner Versuche zu der Annahme gezwungen zu sein, die Ansicht von einer Einheit des Alexins aufgeben und eine Makro- und Mikrocytase annehmen zu müssen.

Das scheinbar Dysteleologische der Ehrlich'schen Auffassung war es wohl mehr als die Versuche der Gegner, weshalb man sich nur so schwer entschließen konnte, den plurimistischen Standpunkt zu acceptieren.

Ohne auf diese Frage des weiteren eingehen zu wollen, sei nur noch hervorgehoben, daß Landsteiner eine vermittelnde Stellung einnimmt. Auch er glaubt — seine Arbeiten befassen sich vorwiegend mit den normalen Agglutininen — nicht mit einer einheitlichen Substanz sein Auskommen zu finden, sondern nimmt eine Mehrheit, allerdings keine Vielheit der vorgebildeten wirksamen Körper an. Durch Kombination verschiedener Agglutinine komme die jedesmalige Wirkung zu stande und in der Bestimmtheit der Kombination für den einzelnen Fall sei die Spezifität des Prozesses begründet. Es kämen also in dem einen Falle die Agglutinine a, b und c, in einem zweiten c, d und e, in einem dritten a, b und d in Frage. Landsteiners Anschauung nähert sich wesentlich der Ehrlich'schen, denn gerade Ehrlich war es, der zuerst in einem Falle von Immunhämolytinen eine partielle Gruppengleichheit verschiedener Tiere experimentell feststellen konnte und später ähnliche Verhältnisse bei den Komplementen nachwies, so daß sowohl ich als auch jüngst Wassermann als ganz natürliche Konsequenz der Ehrlich'schen Lehre den Satz aussprachen, daß wir alle diese Reaktionen nicht so sehr als spezifisch für bestimmte Zellen als für Zellen mit bestimmten Rezeptoren ansehen müssen, und in dieser Formulierung ist ohne weiteres die Möglichkeit einer partiellen Gruppengleichheit zugegeben und von Wassermann erst jüngst in seiner ausgezeichneten Arbeit über die Agglutinine und Präzipitine bewiesen. Die Differenz zwischen Ehrlich und Landsteiner ist also nicht so sehr eine prinzipielle als eine quantitative. Ehrlich nimmt eine partielle Identität als möglich, Landsteiner als Regel an. Gegen die Landsteinersche Annahme sprechen vorläufig noch die von ihm selbst bestätigten Malkoffschen Bindungsversuche. Jedenfalls muß aber auch er eine Mehrheit der einzelnen wirksamen Substanzen annehmen, und es wird sich wohl diese Zahl mit der Zahl der untersuchten Einzelfälle vergrößern.

Es war nur ein Schritt, unsere für den Rezeptorenapparat der tierischen Zelle gewonnenen Erfahrungen auf die Rezeptoren der Bakterien zu übertragen. Auch in den Bakterien müssen wir eine Anzahl vorgebildeter Atomkomplexe annehmen, denen verschiedene Wirkungen zukommen. Einzelne von ihnen lösen die Agglutininproduktion im Tierkörper aus und vermögen die Agglutinine zu binden, andere rufen die Bildung der Immunkörper hervor u. s. w. Durch das Studium des Rezeptorenapparates der Bakterien können wir unseres Erachtens wichtige Aufschlüsse auf dem Gebiete der Immunitätslehre erwarten, und es liegen auch schon einige diesbezügliche Untersuchungen vor, so von Ainley Walker, P. Th. Müller, Hamburger und mir. — Bei diesen Untersuchungen muß man aber in Analogie mit den Befunden an Tieren zu der Fragestellung kommen, ob es sich auch hier stets nur um eine einheitliche Substanz handelt, die eine bestimmte Reaktion auszulösen vermag, oder ob auch bei den Bakterien für dieselbe Wirkung verschiedene Atomkomplexe verantwortlich zu machen sind.

Als ich bereits mit den vorliegenden Untersuchungen beschäftigt war, erschien die bereits erwähnte Publikation von Wassermann,

in welcher er in unseres Erachtens einwandfreier Weise den Nachweis einer Verschiedenheit dieser Gruppen für die Agglutinationsreaktion erbringt.

Auch die Auffassung der Toxine als Rezeptoren ist, wie ich in einer früheren Arbeit bereits auseinandergesetzt habe, statthaft. Es entsteht nun die Frage: Haben wir die Toxine als einheitliche Körper aufzufassen oder als zusammengesetzt aus einer Reihe von Partialtoxinen?

Vereinzelte Beobachtungen liegen über diese Frage bereits vor; so gelang es Ehrlich und Madsen, in den Kulturfiltraten von Tetanusbacillen neben dem Tetanospasmin, dem krampferregenden Gifte, ein blutkörperchenlösendes Gift nachzuweisen; Neisser und Wechsberg führen auf Grund von Bindungsversuchen die hämolytische und leukocide Wirkung des Staphylotoxins auf untereinander verschiedene Gifte zurück, während sie die Frage nach der Existenz eines Nephrotoxins im Staphylotoxin offen lassen mußten. — Markl nahm zwei verschiedene Gifte im Pesttoxin an.

Dagegen galt es bisher als Regel, die Differenzen in den Dosen, die nötig waren, um bei verschiedenen Tieren mit einem bestimmten Toxin die gleiche Wirkung zu erzielen, auf eine verschiedene Empfänglichkeit der Tiere zu beziehen. Daß Differenzen in der Empfindlichkeit, ebenso wie anderen Noxen, auch Giften gegenüber bestehen, ist unzweifelhaft. Die Untersuchung mit chemisch reinen Giften, wie Morphin, Kokain, Strychnin etc., beweisen dies zur Genüge. Daneben besteht aber speziell für die Toxine, die nicht chemisch reine Körper sind, die Möglichkeit, daß ein Teil dessen, was wir als verschiedene Empfindlichkeit bezeichnen, auf die Wirkung verschiedener Toxine, die in quantitativ verschiedenen Verhältnissen vorhanden sind, zurückzuführen ist. Der Lösung der Frage, ob physiologisch gleiche Wirkungen eines Kulturfiltrates bei verschiedenen Tieren durch ein und dasselbe Toxin oder durch verschiedene Toxine herbeigeführt werden, d. h. ob wir auch bei den Toxinen berechtigt sind, von einer Reihe von Partialtoxinen zu sprechen, waren die folgenden Untersuchungen gewidmet.

Zu diesen Untersuchungen schienen mir besonders jene Gifte geeignet, welche eine blutkörperchenauflösende Wirkung haben, weil hier das Experiment im Reagenzglas eine relative Exaktheit gestattet.

Der Weg, der zur Beantwortung der Frage gewählt werden konnte, war nach dem gegenwärtigen Stande unserer Technik ein dreifacher. Entweder es konnte eine Reihe von Toxinen untersucht und der Nachweis gewisser quantitativer Schwankungen in dem Lösungsvermögen verschiedenen Blutkörperchen gegenüber geführt werden oder es konnten Bindungsversuche ein partielles Verschwinden des einen oder des anderen Giftes zeigen, oder schließlich es konnte durch Immunisierung von Tieren eine quantitativ verschiedene Ausbeute an Antitoxinen gegen die verschiedenen Partialtoxine erzielt werden. Ich entschloß mich zu dem letzteren Wege, weil ich dadurch gleichzeitig die Beantwortung einer zweiten Frage erhoffte.

Zu meinen Versuchen wählte ich das Staphylotoxin, von dem uns aus unseren mit Neisser ausgeführten Untersuchungen bekannt war, daß eine Reihe von Blutkörperchen und zwar in verschieden starker Weise von dem Gifte gelöst werden. Mit einem und demselben Filtrate wurden Kaninchen, eine Ziege und ein Hund immunisiert und außerdem

gelangte ein normales Pferdeserum, das bekanntlich relativ hohe Werte von Antistaphylolysin enthält, zur Verwendung.

Diese antitoxischen Sera wurden nun auf ihren Schutzwert geprüft und als Testobjekt verschiedene Blutkörperchen gewählt, die durch das Staphylo toxin gelöst werden. Die Prüfung erfolgte durch dasselbe Staphylo toxin, mit dem die Immunisierung vorgenommen worden war.

Zunächst galt es natürlich, den Lösungswert unseres Kulturfiltrates gegenüber den verschiedenen Blutkörperchen zu bestimmen. Die folgende Tabelle gibt darüber Aufschluß.

Tabelle I.

Toxinmenge	Kaninchenblutkörperchen	Hammelblutkörperchen	Hundeblutkörperchen	Ziegenblutkörperchen	Meerschweinchenblutkörperchen
1,0 ccm	Komplett	Komplett	Komplett	Fast komplett	0
0,5 "	"	"	"	rot	0
0,25 "	"	"	starke "Kuppe	Kuppe	0
0,1 "	"	"	Kuppe	"	0
0,05 "	inkomplett	"	Spur	"	0
0,025 "	rot	"	0	"	0
0,01 "	Kuppe	"	0	Spur	0
0,005 "	Spur	inkomplett	0	"	0
0,0025 "	"	Kuppe	0	"	0
0,001 "	0	Spur	0	0	0
0,0005 "	0	0	0	0	0

Alle Blutkörperchen wurden mit der ihnen entsprechenden isotonen NaCl-Lösung öfters gewaschen, dann mit NaCl-Lösung auf das ursprüngliche Blutvolumen aufgefüllt. Zu jedem Röhrchen kam 1 ccm der 5-proz. Blutaufschwemmung.

Aus dieser Tabelle ergibt sich, daß unser Staphylo toxin 1 Tropfen Kaninchenblut in der Dose von 0,1 ccm komplett zu lösen vermag, Hammelblutkörperchen noch in der Dose von 0,01 ccm, Hundeblutkörperchen in der Dose von 0,5 ccm vollständig gelöst werden, während Ziegenblutkörperchen durch 1,0 ccm Toxin noch nicht komplett aufgelöst und bei Meerschweinchenblutkörperchen auch nicht eine Spur von Lösung erzielt werden konnte.

Eine derartige Differenz in der Löslichkeit verschiedener Blutarten wurde bisher einfach durch eine verschiedene Empfindlichkeit der betreffenden Blutkörperchen erklärt, indem man sich wohl vorstellte, daß in dem einen Falle zur Erzielung des gleichen Effektes eine größere Anzahl von Toxinmolekülen nötig war als in dem anderen, und auf diese Weise sich die Differenz in der komplett lösenden Toxindose erklären lasse.

Vergleichen wir die bei der Auswertung unseres Toxin gefundenen Werte mit jenen, die Neisser und ich seiner Zeit in unserer Arbeit über das Staphylo toxin publiziert haben, so ergibt sich bereits eine Differenz in den relativen Werten der einzelnen komplett lösenden Dosen. So verhielt sich die einfach komplett lösende Dose für Kaninchenblutkörperchen, zu der für Hammelblutkörperchen in unserem Falle wie 1:10, während in den von Neisser und mir publizierten Versuchen das Verhältnis größer war, als 20:1, also eine ganz enorme Differenz. Ich kann jedoch diese Differenz zu keinem strikten Beweise verwenden, da die Blutkörperchen, für welche diese Toxine geprüft wurden, von ganz verschiedenen Tieren stammten, und sich, wie wir

jetzt durch vielfältige Erfahrung wissen, ganz bedeutende Differenzen im Rezeptorenapparate zwischen den Tieren derselben Species finden. Es wurden ferner durch unser Toxin Meerschweinchenblutkörperchen gar nicht gelöst, während Neisser und ich eine wenn auch nicht starke, so doch recht deutliche Lösung konstatiert hatten.

Weit wertvoller für die Beurteilung der Frage nach der Vielheit der Toxine scheint mir jedoch eine Beobachtung, die ich bei der Bestimmung der Wertigkeit unseres Toxins für Hammelblutkörperchen gemacht hatte. Die Prüfungstechnik war die usuelle. Es wurde 1 ccm der 5-proz. Blutaufschwemmung mit wechselnden Mengen des Toxins versetzt, durch 2 Stunden im Thermostaten bei 37° belassen und dann bis zum nächsten Tage im Eisschranke aufbewahrt. Bei dieser Versuchsanordnung läßt sich bei Kaninchenblutkörperchen der Grenzwert der kompletten Lösung nach 2 Stunden Aufenthalt im Thermostaten schon annähernd bestimmen, während die geringeren Grade der Lösung erst am nächsten Tage manifest werden.

Anders verhält es sich jedoch bei der Lösung der Hammelblutkörperchen. Hier konnte ich nach 2 Stunden Thermostat in jenem Reagenzröhrchen, das 1,0 ccm Toxin enthielt, eine vollständige Auflösung der Blutkörperchen konstatieren, während in den übrigen Röhrchen die Sedimentierung der Blutkörperchen bereits begonnen hatte, die darüber stehende Flüssigkeit jedoch vollständig farblos war, also keine Spur von Lösung zeigte. Als ich am nächsten Tage die Röhrchen dem Eisschranke entnahm, fand sich bis zur Dose von 0,0025 ccm hinab der obere Teil der Flüssigkeit in den Röhrchen vollkommen farblos, während die untere Hälfte dunkelrot gefärbt war, die Lösung also scheinbar etwa dem Lösungswerte „Kuppe“ entsprochen hätte. Als jedoch die Röhrchen aufgeschüttelt wurden, bemerkte ich, daß nur in Röhrchen mit 0,005 ccm Toxin geringe und erst bei 0,0025 ccm deutliche Reste ungelöster Blutkörperchen vorhanden waren, daß also bis zum Werte von 0,01 ccm eine komplette Lösung erfolgt war.

Dieser Befund ist meines Erachtens nur so zu deuten, daß die Hammelblutkörperchen das Gift rasch, noch vor ihrer Sedimentierung gebunden hatten, die Lösung jedoch erst spät nach erfolgter Sedimentierung der Blutkörperchen erfolgte, oder anders ausgedrückt, daß bei den Hammelblutkörperchen ein Gift in Wirksamkeit trete, das sich rasch bindet, jedoch eine lange Inkubationszeit hat, d. h. eine lange Latenzperiode vom Zeitpunkte der Vergiftung (Bindung) bis zum Auftreten der Vergiftungssymptome, während bei den Kaninchenblutkörperchen das Gift rasch angreift und auch relativ rasch löst. Dem eventuellen Einwand, dieser Vorgang sei nicht so sehr in der Eigenart des Toxins begründet, sondern in der Eigenart der Hammelblutkörperchen, widerspricht die Erfahrung, daß Hammelblutkörperchen, durch andere hämolytische Agentien beeinflußt (hämolytisches Immuneserum), ebenso schnell ihr Hämoglobin abgeben wie andere Blutkörperchen.

Diese Befunde scheinen mir schon für eine Verschiedenheit der Gifte zu sprechen; doch möchte ich auf ihnen keine Schlüsse aufbauen, sondern erwähne sie nur als unterstützende accidentelle Befunde, da der Weg unserer Beweisführung ein anderer war.

Nach Auswertung des Toxins galt es nun, die Wertigkeit unserer antitoxischen Sera bei Einstellung auf die verschiedenen Blutkörperchen zu prüfen.

Zunächst möchte ich einer Abweichung von der usuellen Bestimmung Erwähnung tun, zu der ich durch die Verhältnisse genötigt war. Im allgemeinen verwendet man als Testdosis ein Multiplum der komplett lösenden (einfach tödlichen) Dosis. Da ich jedoch mit meinem Staphylo-toxin bei Ziegenblutkörperchen auch durch 1,0 ccm Toxin noch keine vollständige Lyse erzielen konnte, ich jedoch von einem gleichmäßigen Lösungswerte ausgehen wollte, wählte ich einen anderen, ziemlich wohlcharakterisierten Lösungswert, das ist die Lösung „Kuppe“, welche ich als einfache Testdosis (TD) bezeichne. Die Prüfung erfolgte nun in der Weise, daß ein Multiplum der einfachen TD mit abfallenden Mengen antitoxischen Serums gemischt, dieses Toxinantitoxingemisch 1 Stunde im Brutschranke blieb behufs möglichst vollständiger Bindung von Toxin und Antitoxin, dann Blutaufschwemmung zugefügt und schließlich in der gewöhnlichen Weise beobachtet wurde.

Die Aufklärung für die Tatsache, daß nicht stets das gleiche Multiplum der einfachen TD verwendet wurde, ist dadurch gegeben, daß ich mich zunächst durch Vorversuche von den Lösungsverhältnissen der einzelnen Blutkörperchen überzeugt hatte, jedoch stets gelegentlich der Auswertung der antitoxischen Sera eine neuerliche Auswertung des Toxins für das betreffende Blut vornahm, das zu dem Versuche verwendet wurde, da mir aus meinen früheren Versuchen mit Neisser bekannt war, daß geringe individuelle Schwankungen in der Löslichkeit zwischen den einzelnen Tieren derselben Species bestehen. So kam es, daß ich mit der 4-fachen TD arbeiten wollte, diese Menge Toxin aber für das zum Versuche benutzte Blut nur die doppelte oder in einem anderen Falle wieder die 8-fache TD darstellte. Dies nur zur Aufklärung. Für das Wesen der Versuche und Versuchsergebnisse ist jedoch diese Tatsache vollkommen belanglos, da es nur auf relative Werte ankam.

In den folgenden 4 Tabellen erscheinen die Versuchsergebnisse wieder gegeben.

Tabelle II.

Blutmenge	Toxinmenge	Antitoxinmenge	1	2	3	4
			Kaninchenserum	Hundeserum	Ziegenserum	Pferdeserum
1,0 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung von gewaschenem Kaninchenblut	0,02 ccm = 2 TD	1,0 ccm	0	0	0	0
		1/2 "	0	0	0	0
		1/4 "	0	0	0	0
		1/8 "	0	0	0	0
		1/16 "	0	0	0	0
		1/32 "	0	0	0	0
		1/64 "	0	0	0	0
		1/128 "	Spur	0	0	0
		1/256 "	Kuppe	0	0	0
		1/512 "	"	Spur	Spur	Spur
		1/1024 "	starke Kuppe	Kuppe	Kuppe	Kuppe
		1/2048 "	" "	" "	" "	" "
		1/4096 "	" "	starke Kuppe	starke Kuppe	starke Kuppe
		1/8192 "	" "	" "	" "	" "
1/16384 "	" "	" "	" "	" "		

Tabelle III.

Blutmenge	Toxinmenge	Antitoxinmenge	1	2	3	4
			Kaninchen-serum	Hundeserum	Ziegenserum	Pferdeserum
1,0 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung v. gewaschenem Hammelblut	0,02 ccm = 8 TD	1,0 ccm	0	0	0	0
		$\frac{1}{2}$ "	0	0	0	0
		$\frac{1}{4}$ "	0	0	0	0
		$\frac{1}{8}$ "	0	0	0	0
		$\frac{1}{16}$ "	0	0	0	0
		$\frac{1}{32}$ "	0	0	0	0
		$\frac{1}{64}$ "	Spur	0	0	0
		$\frac{1}{128}$ "	Kuppe rot	0	0	0
		$\frac{1}{256}$ "	rot	0	0	0
		$\frac{1}{512}$ "	"	Spur	0	0
		$\frac{1}{1024}$ "	inkomplett	Kuppe rot	Spur	Kuppe
		$\frac{1}{2048}$ "	komplett	"	inkomplett	"
		$\frac{1}{4096}$ "	"	"	komplett	rot
		$\frac{1}{8192}$ "	"	"	"	komplett
		$\frac{1}{16384}$ "	"	"	"	"

Tabelle IV.

Blutmenge	Toxinmenge	Antitoxinmenge	1	2	3	4
			Kaninchen-serum	Hundeserum	Ziegenserum	Pferdeserum
1,0 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung von gewaschenem Ziegenblut	0,2 ccm = 8 TD	1,0 ccm	0	0	0	0
		$\frac{1}{2}$ "	0	0	0	0
		$\frac{1}{4}$ "	0	0	0	0
		$\frac{1}{8}$ "	Spur	0	0	0
		$\frac{1}{16}$ "	"	0	0	0
		$\frac{1}{32}$ "	"	0	0	0
		$\frac{1}{64}$ "	Kuppe	0	0	0
		$\frac{1}{128}$ "	"	0	0	0
		$\frac{1}{256}$ "	"	0	0	Spur
		$\frac{1}{512}$ "	"	Spur	0	"
		$\frac{1}{1024}$ "	"	"	0	Kuppe
		$\frac{1}{2048}$ "	"	"	Kuppe	"
		$\frac{1}{4096}$ "	"	"	"	"
		$\frac{1}{8192}$ "	"	"	"	"
		$\frac{1}{16384}$ "	"	"	"	Kuppe

Tabelle V.

Blutmenge	Toxinmenge	Antitoxinmenge	1	2	3	4
			Kaninchen-serum	Hundeserum	Ziegenserum	Pferdeserum
1,0 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung von gewaschenem Hundelblut	0,5 ccm = 5 TD	1,0 ccm	0	0	0	0
		$\frac{1}{2}$ "	0	0	0	0
		$\frac{1}{4}$ "	0	0	0	Kuppe
		$\frac{1}{8}$ "	0	0	0	"
		$\frac{1}{16}$ "	Kuppe	0	0	inkomplett
		$\frac{1}{32}$ "	"	0	0	komplett
		$\frac{1}{64}$ "	rot	0	Kuppe	Kuppe
		$\frac{1}{128}$ "	fast komplett	komplett	fast komplett	fast komplett
		$\frac{1}{256}$ "	komplett	"	komplett	komplett
		$\frac{1}{512}$ "	"	"	"	"
		$\frac{1}{1024}$ "	"	"	"	"
		$\frac{1}{2048}$ "	"	"	"	"
		$\frac{1}{4096}$ "	"	"	"	"
		$\frac{1}{8192}$ "	"	"	"	"
		$\frac{1}{16384}$ "	"	"	"	"

Wir ersehen aus diesen Versuchen zunächst, daß die einzelnen Sera untereinander im Werte verschieden sind, ein Faktum, welches uns nur ein Ausdruck für die verschieden starke Reaktion der betreffenden Tiere auf das eingeführte Toxin bezüglich der Bildung des Antitoxins ist.

Auffallend werden jedoch die Befunde, wenn wir die Versuchsergebnisse in den einzelnen Tabellen untereinander vergleichen.

Betrachten wir z. B. die Kolonne 3 in allen Tabellen, so ersehen wir daraus folgendes:

Benutzen wir als Index für die Wertbestimmung unseres Ziegenimmunsersums Kaninchenblutkörperchen, so werden 0,02 ccm des Toxins durch $\frac{1}{256} = 0,00390625$ ccm des antitoxischen Serums vollständig neutralisiert, so daß keine Spur von Lösung auftritt. Es würde also, auf die Einheit ausgerechnet, 1,0 ccm Staphylo toxin durch 0,2 ccm Ziegen serum vollständig neutralisiert werden.

Verwenden wir jedoch als Testobjekt Hammelblutkörperchen, so würde nach analoger Rechnung 1 ccm Staphylo toxin durch 0,1 ccm Ziegen serum, bei Verwendung von Ziegenblutkörperchen 1 ccm Staphylo toxin durch 0,0025 ccm und bei Hundebloodkörperchen 0,06 ccm Ziegen serum vollständig neutralisiert wird.

Diese auf den ersten Blick etwas eigenartigen Verhältnisse gestatten nach meiner Ansicht nur eine zweifache Deutung. Entweder ist diese Verschiedenheit in der Antitoxinmenge, die zur Neutralisation der gleichen Toxinmenge nötig ist, nur der Ausdruck der verschiedenen Avidität des Toxins zu dem zweiten variierten Faktor, den Blutkörperchen, oder es gibt für die verschiedenen Blutkörperchen in dem Staphylo toxin untereinander verschiedene hämolytische Gifte und das immunisierte Tier erzeugt gegen die einzelnen Partialtoxine auch quantitativ verschiedene Partialantitoxine.

Wollen wir zunächst die erste Deutung auf ihre Stichhaltigkeit prüfen, so müßten wir annehmen, daß unter den gewählten Beispielen die Ziegenblutkörperchen die geringste Avidität zum Toxin haben, weil wir in diesem Falle durch die kleinste Dose Antitoxin eine bestimmte Menge Toxin neutralisieren können, während die Kaninchenblutkörperchen die avidesten wären. Man müßte sich vorstellen, daß die bereits fertige Verbindung Toxinantitoxin durch die stärkere Avidität der bindenden Gruppe am Kaninchenblutkörperchen gesprengt wird, und daß erst durch sehr große Dosen Antitoxin (nach dem Prinzip der chemischen Massenwirkung) diese Sprengung vereitelt wird. Die Unhaltbarkeit dieser Erklärung wird jedoch sogleich klar, wenn wir uns in ganz analoger Weise, wie für das Ziegen serum, die Werte für die anderen geprüften Sera berechnen. — Wäre die verschiedene Avidität der Blutkörperchen der ausschlaggebende Faktor, dann müßten wir auch bei den anderen Seris bei Einstellung auf verschiedene Blutkörperchen verschiedene Antitoxinwerte erreichen, stets aber müßte die Serummenge bei der avidesten Blutkörperchenart am größten, bei der wenigst aviden am geringsten sein.

Führen wir dieses Rechenexempel aus, so finden wir, daß neutralisiert wird:

1 ccm Toxin durch	0,78 ccm	Kaninchenser.	bei Einstellg.	auf	Kaninchenblutkörperchen
1 " " "	1,56 " "	" "	" "	" "	Hammelblutkörperchen
1 " " "	1,25 " "	" "	" "	" "	Ziegenblutkörperchen
1 " " "	0,25 " "	" "	" "	" "	Hundebloodkörperchen

Daß ferner neutralisiert wird:

1 ccm Toxin durch	0,2 ccm Hundeserum	bei Einstellung auf	Kaninchenblutkörperchen
1 " " "	0,2 " "	" "	Hammelblutkörperchen
1 " " "	0,02 " "	" "	Ziegenblutkörperchen
1 " " "	0,2 ⁵ " "	" "	Hundeblutkörperchen

Ferner:

1 ccm Toxin durch	0,2 ccm Pferdeserum	bei Einstellung auf	Kaninchenblutkörperchen
1 " " "	0,025 " "	" "	Hammelblutkörperchen
1 " " "	0,04 " "	" "	Ziegenblutkörperchen
1 " " "	1,0 " "	" "	Hundeblutkörperchen

Es würden demnach bei der Prüfung des Kaninchenserums die Hundeblutkörperchen die wenigst aviden sein, bei der Prüfung des Pferdeserums die avidesten, während sich beim Pferdeserum die Hammelblutkörperchen als die am wenigsten aviden, bei Prüfung des Kaninchenserums als die avidesten erweisen würden, und nach der Prüfung von Hunde- und Ziegenserum die Ziegenblutkörperchen die am wenigsten aviden wären.

Es ergibt sich also die Unhaltbarkeit der ersten Annahme, und es bleibt unseres Erachtens nur eine Lösung dieser Frage: Daß die Lösung der verschiedenen Blutkörperchen durch das Staphylotoxin nicht auf ein einheitliches Gift zurückzuführen ist, sondern daß für die verschiedenen Blutkörperchen verschiedene lytische Toxine vorhanden sind.

Wir glauben also auf Grund unserer Versuche berechtigt zu sein, den Satz aufzustellen, daß das Staphylotoxin — und so weit eine Verallgemeinerung überhaupt zulässig ist — wahrscheinlich auch eine Reihe anderer Toxine zusammengesetzt sind aus einer großen Anzahl von Partialtoxinen, und daß bei der Immunisierung mit einem solchen toxischen Gemisch den Partialtoxinen entsprechend in verschiedenen quantitativen Verhältnissen Partialantitoxine produziert werden.

Eine weitere Frage ist es, ob für jede Tierart nur ein Partialtoxin oder deren mehrere in Frage kommen. — Ich glaube mich, zum Teil nach Analogie mit anderen ähnlichen Erscheinungen, hauptsächlich aber durch einen Versuch von Kraus, der meiner Ansicht nach nur unter dieser Annahme seine einfache Deutung findet, für die zweite Möglichkeit aussprechen zu müssen. Kraus fand gelegentlich seiner Versuche über das akut tödende Gift eines Vibrio, über die er demnächst berichten wird, eine für Kaninchen einfach tödliche Dose, die durch eine bestimmte Menge eines antitoxischen Immunserums vollständig neutralisiert wurde. Die doppelte tödliche Dose wurde durch die doppelte Menge Antitoxin, die dreifache Toxinmenge durch die dreifache Antitoxinmenge neutralisiert u. s. w. nach dem Gesetze der Multipla. Kraus fand aber des weiteren, daß auch normales Ziegenserum antitoxische Eigenschaften besitzt, und daß die einfach tödliche Dose durch eine bestimmte Menge des normalen Serums sicher neutralisiert werden konnte. — Sobald er aber auch hier das Gesetz der Multipla zur Anwendung bringen wollte, sah er, daß schon gegen die doppelte tödliche Dose auch ein Vielfaches der nach der Rechnung nötigen Serummenge vollständig unwirksam blieb.

Diesen Versuch bin ich nun geneigt so zu erklären, daß ich annehme, daß das akut tödliche Vibriogift kein einheitliches ist, sondern, sagen wir der Einfachheit wegen, ein aus zwei untereinander verschie-

denen Partialtoxinen zusammengesetztes, in der einfach tödlichen Dose des Giftes, also eine gewisse Menge des Giftes α ($T\alpha$) und eine gewisse Menge des Giftes β ($T\beta$) enthält. Weder die Menge $T\alpha$ noch die Menge $T\beta$ repräsentieren für sich eine vollständige tödliche Dose, erst $T\alpha + T\beta$ vermögen das Tier zu töten. — Das normale Ziegen Serum enthält jedoch nur ein Antitoxin gegen α . $A\alpha$ sei die zur Neutralisierung von $T\alpha$ nötige Menge Antitoxin. Mischen wir nun $T\alpha + T\beta$, die einfach tödliche Dose mit jener Serummenge, welche $A\alpha$ enthält, so wird $T\alpha$ durch $A\alpha$ neutralisiert und es bleibt $T\beta$, nicht neutralisiert, übrig. Da diese Menge des Giftes β jedoch nicht genügt, das Tier zu töten, so können wir gegen die einfach tödliche Dose des Vibriogiftes das Tier mit normalem Ziegen Serum schützen. Nehmen wir aber die doppelt tödliche Dose, so enthält dieselbe $2 T\alpha + 2 T\beta$, und versuchen wir, durch die doppelte Serummenge, die $2 A\alpha$ enthält, zu neutralisieren, so bleiben jetzt $2 T\beta$ übrig, und diese Menge des Giftes β genügt, das Tier zu töten. Der Effekt wird aber derselbe bleiben, ob ich jetzt die doppelte, 3-, 4-, 5- u. s. w.-fache Dose des antitoxischen Serums nehme, stets bleibt das Gift β ungesättigt und wir haben durch die größeren Serumdosen höchstens freie $A\alpha$ neben den nicht neutralisierten $2 T\beta$.

Unter der Annahme, daß für das Versuchstier im Falle Kraus zwei Partialtoxine in Frage kämen, ist das Resultat des Versuches einfach zu deuten. — Das Immunserum gegen das Vibriogift enthält ein Antitoxin gegen das Gift α und gegen das Gift β , und deshalb gelingt die Neutralisierung nach dem Gesetze der Multipla.

Weiteren Versuchen muß die Entscheidung der Frage vorbehalten bleiben, ob zwischen den einzelnen Tieren eine partielle Identität der Partialtoxine und -antitoxine besteht oder nicht, ob also die Wirkung im einzelnen Falle im Sinne Landsteiners durch eine bestimmte Kombination der einzelnen Elemente zu stande kommt, oder ob für jedes Tier (Blutkörperchenart) spezifische Partialtoxine bestehen. Ich möchte die Annahme einer partiellen Gruppenidentität nicht für ausgeschlossen erachten.

Soviel aber möchte ich durch meine Versuche für erwiesen halten, daß eine Mehrheit von Toxin und Antitoxin besteht, und daß dieser Tatsache eine gewisse Bedeutung in theoretischer und praktischer Beziehung nicht abzuspochen ist.

So wird es weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zu entscheiden, inwieweit das, was wir bisher als verschiedene Empfindlichkeit der Tiere bezeichnet haben, als Verschiedenheit in der Menge der einzelnen Partialtoxine und damit der Wirkung eines Toxins für eine bestimmte Tierart aufzufassen ist.

Bei der weitgehenden Analogie in den prinzipiellen Punkten zwischen dem Rezeptorenapparate der Bakterien und den tierischen Zellen werden wir erwarten können, daß auch in dem Rezeptorenapparate der Bakterien individuelle Schwankungen möglich sein werden, d. h. daß wir im speziellen Falle der Toxine neben gewissen konstanten Partialtoxinen individuellen Schwankungen in anderen begegnen werden, wie wir ja schon in dem von uns untersuchten Staphylotoxin kein Lysin für Meerschweinchenblutkörperchen fanden, während Neisser und Verf. seinerzeit deutlich ein solches nachweisen konnten. — Durch derartige individuelle Schwankungen wird das wechselnde Krankheitsbild verständlich, das ein und derselbe Mikroorganismus beim Menschen hervorrufen kann, wie andererseits auch gewisse Epidemien ein und derselben

Krankheit oft durch ganz bestimmte Symptome charakterisiert sind. So führt ja, um nur ein recht bekanntes Beispiel herauszugreifen, die Infektion mit Typhusbacillen in dem einen Falle zu stärkeren Störungen von Seite des Sensoriums, in anderen wieder prävalieren die Symptome der Affektion des Darmtraktes, eine Differenz, die den Kliniker früher zu einer doppelten Bezeichnung des Krankheitsbildes führte.

Dreyer und Madsen zeigten bekanntlich, daß Antitoxin- und Toxingemische, die für Meerschweinchen nur noch Toxonwirkung zeigten, deren Toxin also scheinbar vollkommen abgesättigt war, auf Kaninchen noch als Toxine wirkten. Dieser Versuch, der von den Gegnern der Ehrlichschen Lehre vielfach als gegen die Richtigkeit der Theorie sprechend angesehen wurde, findet meines Erachtens eine einfache Lösung in der Annahme zweier verschiedener Toxine für Kaninchen und Meerschweinchen und ein für Meerschweinchen neutrales Toxin-Antitoxingemisch ist eben nur ein für Meerschweinchen neutrales, während damit noch nicht gesagt ist, daß auch das für Kaninchen pathogene Partialtoxin gesättigt ist, genau wie unser für Ziegenblutkörperchen neutrales Toxin-Antitoxingemisch seiner lösenden Eigenschaften für Kaninchenblutkörperchen noch nicht beraubt ist.

In Parenthese sei nur bemerkt, daß auch die Metschnikoffschen Versuche mit Skorpiongift und dessen Neutralisierung durch Krebsblut an Krebsen und Mäusen in analoger Weise eine befriedigende Lösung finden, welche Deutung schon Aschoff in seinem ausgezeichneten Sammelreferate über Ehrlichs Seitenkettentheorie gegeben hatte.

Von Interesse scheint mir der Nachweis von der Vielheit der Toxine auch für die Frage der partiellen Giftabsättigung nach Ehrlich, die durch die Untersuchungen von Arrhenius und Madsen und Gruber und v. Pirquet neuerdings in Fluß gebracht worden ist. Ohne auf die so überaus interessanten Versuche der genannten Autoren hier näher eingehen zu wollen, die auf Grund der Analogie der Absättigungskurven die Einteilung in Proto-, Deutero- und Tritotoxine verwerfen und ein einheitliches Toxin annehmen, scheint es mir unter dieser Annahme bisher nicht recht verständlich, warum wir denn, von einem bestimmten Absättigungsgrade angefangen, sowohl beim Tetanolysin (Madsen) als auch beim Staphylolysin (Neisser und Wechsberg) nur spurweise Lösung erhalten und selbst vielfache Multipla stets nur den gleichen Lösungsaffekt aufzubringen vermögen. — Würde es sich um ein einheitliches Toxin handeln, so sollte man erwarten, daß große Multipla auch eines kleinen Giftrestes doch endlich komplette Lösung herbeiführen können. — Ich will jedoch auf diese Frage ebensowenig wie auf die derselben Streitfrage gewidmete jüngste Publikation Bordets eingehen, sondern nur die Möglichkeit andeuten, daß durch den Nachweis der Partialtoxine und Partialantitoxine auch die Frage der partiellen Giftabsättigung eventuell anders zu deuten wäre, als durch das Nacheinanderabsättigen von Proto-, Deutero- etc.-Toxin-Toxoid etc.

Nehmen wir exempli causa an, daß zur Lösung einer bestimmten Blutkörperchenart zwei verschiedene Partialtoxine in Frage kommen, a und b, welche, wie wir der Einfachheit wegen annehmen wollen, zu gleichen Teilen in dem Kulturfiltrate vorhanden wären. Zur Lösung einer bestimmten Menge Blutes wäre nun eine bestimmte Menge Kulturfiltrat nötig, die 100 a- und 100 b-Moleküle enthalten würde. Immunisieren wir nun ein Tier gegen dieses Filtrat, so werden, wie wir aus unseren Versuchen ersehen haben, die einzelnen Partialantitoxine nicht quantitativ

gleich gebildet. Nehmen wir beispielsweise an, es würden in unserem Fall 10mal soviel Anti-a (Aa) gebildet als Anti-b (Ab), so würden in einer bestimmten Menge Serum 10 Aa und 1 Ab enthalten sein. Wollen wir nun die früher bezeichnete Filtratmenge 100a + 100b absättigen, so brauchen wir dazu eine Serummengende die 1000 Aa + 100 Ab enthält. Durch kleinere Serummengen würde wohl das Partialtoxin a neutralisiert werden, aber es würden noch freie b-Moleküle vorhanden sein, wir würden daher nicht zur vollständigen Neutralisation kommen. 100a + 100b werden also durch 1000 Aa + 100 Ab komplett neutralisiert. Sättigen wir jetzt unsere Toxinmenge partiell ab und fügen wir zunächst nur $\frac{1}{10}$ der zur vollständigen Neutralisation nötigen Serummengende hinzu, so werden in diesem Zehntel 100 Aa + 10 Ab enthalten sein. Diese Menge würde aber genügend sein, das a-Toxin vollständig und noch 10 b-Toxineinheiten abzusättigen, so daß durch Hinzufügen des ersten Zehntels der zur vollständigen Neutralisierung nötigen Serummengende von 200 Toxineinheiten bereits 110 verschwinden, anstatt, wie man ursprünglich erwarten sollte, 20. Wir könnten also von der Annahme eines Proto-, Deutero-, Tritotoxins absehen, und die eigenartigen steilen Kurven, welche man für die Werte der partiellen Absättigung erhält, würden sich einfach als die Resultierende darstellen aus der gleichzeitigen Absättigung zweier oder mehr Partialtoxine, gegen welche in dem betreffenden Immunserum Partialantitoxine in verschiedenen quantitativen Verhältnissen vorhanden sind. Ob daneben für jedes dieser Partialtoxine in seiner Bindung mit dem Antitoxin jene Gleichgewichtszustände in Frage kommen, bleibe dahingestellt. Jedenfalls wäre durch unsere Auffassung neben den eigentümlichen quantitativen Verhältnissen auch die qualitativ verschiedene Wirkung des Giftrestes erklärt. — Weitere Untersuchungen müßten nun dahin gehen, wie sich die Absättigungskurve verhält, je nachdem die partielle Absättigung mit dem Immunserum dieses oder jenes Tieres vorgenommen wird. Ausdrücklich sei aber hervorgehoben, daß unseres Ermessens die von uns vorgeschlagene Auffassung ebensowenig das Wesen der Ehrlichschen Theorie trifft, wie die der oben genannten Forscher; dieselbe erscheint in dem Nachweise des Toxoides begründet, nicht aber in dem des Proto-, Deutero- und Tritotoxins.

Auch praktisch käme meines Erachtens dem Nachweise der Partialtoxine und ihrer Antitoxine eine Bedeutung zu, und zwar zunächst für die Wertbestimmung unserer antitoxischen Sera, ferner für die Erzeugung möglichst günstig wirkender antitoxischer Heilsera.

Auf Grund äußerst mühsamer Untersuchungen ist es Ehrlich gelungen, eine brauchbare und für Deutschland obligatorisch eingeführte Aichungsmethode des Diphtherieserums festzustellen. Die Bedeutung der Wertbestimmung eines Serums liegt ja auf der Hand, da wir nur durch eine solche im stande sind, eine wirkliche Dosierung des Serums bei Anwendung zu Heilzwecken vorzunehmen.

Es entsteht aber die Frage: Ist der im Tierversuch gefundene Wert eines Serums tatsächlich ein Maßstab für seine Wertigkeit¹⁾ bei der therapeutischen Anwendung

1) Unter Wertigkeit eines Serums ist hier, wie sich aus dem Vorstehenden ergibt, nur jener Maßstab für seine Wirksamkeit gemeint, der sich in seinem Gehalt an Immunitätseinheiten ausdrückt.

am Menschen? Und diese Frage können wir auf Grund unserer Versuche nicht ohne weiteres bejahen.

Das Wesen einer jeden Wertbestimmung liegt in der vergleichsweisen Einstellung eines Standardserums und des auf seinen Wert zu prüfenden antitoxischen Serums gegen ein gewisses Gift. Nehmen wir für unseren mitgeteilten Versuch das Kaninchenserum als Testserum an, so wären, wie sich leicht aus der Tabelle II berechnen läßt, bei Einstellung auf Kaninchenblutkörperchen sämtliche anderen auf ihre Wertigkeit zu prüfenden Sera (Ziegenserum, Hundeserum und Pferdeserum) 4mal stärker, als das Kaninchenserum. Bezeichnen wir die in 1 ccm unseres Kaninchenserums enthaltene Antitoxinmenge mit 1 I.-E. (Immunitätseinheit), so würden die übrigen Sera je 4 I.-E. im Kubikcentimeter enthalten. Es wären also alle geprüften Sera für eine therapeutische Anwendung gleichwertig.

Hätten wir jedoch die Prüfung nicht auf Kaninchen, sondern beispielsweise auf Ziegenblutkörperchen (Tab. IV) vorgenommen, so würde sich durch analoge Rechnung ergeben, daß, wenn wir wieder die im Kubikcentimeter Kaninchenserum vorhandene Antitoxinmenge als Einheit annehmen, das Hundeserum 64, das Ziegenserum 512 und das Pferdeserum 32 I.-E. enthalten würde. Während wir also bei der ersten Wertbestimmung diese drei Sera als gleichwertig betrachten müßten, und sie selbst wieder alle 4mal so stark wirksam als das Testserum, wäre nach dem Ausfall der zweiten Bestimmung das Ziegenserum 8mal stärker als das Hundeserum und 16mal stärker als das Pferdeserum. Wieder andere Daten ergeben sich durch Rechnung aus den Tabellen III und V.

Uebertragen wir nun diese Versuchsergebnisse auf die Praxis, so sind wir zu dem Schlusse gezwungen, daß der im Tierversuch gefundene Wert für ein Serum nicht ohne weiteres bestimmend sein kann für seinen Wert in der menschlichen Therapie.

Da natürlich eine Auswertung eines Serums am Menschen nicht durchführbar ist, so können wir erst dann die im Laboratorium bestimmten Werte eines antitoxischen Serums als bindend für ihre Anwendung am Menschen erachten, wenn die gleichzeitige klinische Beobachtung ergibt, daß die im Tierversuch gewonnenen Werte parallel laufen mit dem Heileffekte beim Kranken, daß wirklich ein im Laboratorium höher bewertetes Serum sich auch in der klinischen Therapie als wirksamer erweist. Für das Diphtherieserum ist durch vieltausendfache Beobachtung der Beweis erbracht, daß eine solche Kongruenz besteht, und deshalb dürfen wir wohl auch weiterhin die Prüfungsresultate am Meerschweinchen als Maßstab für die Wertigkeit des Diphtherieheilserums in der menschlichen Therapie ansehen. Da wir aber beim weiteren Ausbau der Lehre wohl die Hoffnung hegen dürfen, auch andere brauchbare antitoxische Heilsera erzeugen zu können, so müssen wir auf Grund unserer obenstehenden Deduktionen die Forderung erheben, daß für jedes neue Heilserum erst wieder der Beweis zu erbringen ist, daß der Tierversuch uns wirklich den richtigen Maßstab für die Wertigkeit des Serums beim Menschen gibt, und immer wieder werden viele parallel laufende Beobachtungen im Laboratorium und am Krankenbette nötig sein, die Richtigkeit der im speziellen Falle gewählten Prüfungstechnik zu beweisen. Es ist ja selbstverständlich und bereits des öfteren betont worden, daß für den Heileffekt noch eine

Reihe anderer Faktoren in Frage kommen, so in erster Linie die Aviditätsverhältnisse zwischen Toxin und Antitoxin einerseits und Körperzelle und Toxin andererseits.

Ebensowenig bedarf es wohl kaum einer besonderen Erwähnung, daß für die hier besprochenen Verhältnisse eine Verallgemeinerung für alle Toxine stets nur mit einer gewissen Reserve auszusprechen ist, wie wir ja gerade in der Immunitätslehre es gelernt haben, jeden einzelnen Fall streng zu individualisieren. Eine einseitige Betonung der von uns vorgelegten Tatsachen wäre ebenso ein Fehler, wie unseres Erachtens die vollständige Außerachtlassung derselben.

Die Differenz zwischen den einzelnen Partialtoxinen, soweit solche überhaupt nachweisbar sind, kann sich entweder auf eine Verschiedenheit in der haptophoren und toxophoren Gruppe erstrecken, oder nur bezüglich der toxophoren zum Ausdruck kommen. Zu den letzteren scheint, soweit unsere bisherigen Untersuchungen reichen, das Diphtherietoxin zu gehören, indem Ehrlich bei dem Proto-, Deutero- und Tritotoxin eine Identität der haptophoren Gruppe annimmt. In diesem Falle wird ein Antitoxin gegen alle Partialtoxine wirksam sein. Bezieht sich aber, wie es nach unseren Untersuchungen beim Staphylotoxin der Fall zu sein scheint, die Differenz sowohl auf die haptophore als auch auf die toxophore Gruppe, dann werden sich auch sämtliche von uns klargelegten Konsequenzen geltend machen.

Die Bildung der Partialantitoxine wird aber auch in diesem Falle abhängig sein von dem Rezeptorenapparate des betreffenden immunisierten Tieres, so daß wir auch bei Immunisierung zweier verschiedener Tiere gegen die gleichen Partialtoxine Partialantitoxine werden erhalten können, falls in dem gewählten Falle die beiden Tiere gerade in den in Betracht kommenden Rezeptoren eine Identität aufweisen. Zwei solche Sera werden sich dann bezüglich ihres Heilwertes auch für verschiedene Tiere stets entsprechend ihrem Gehalt an I.-E. verhalten, von den anderen, früher erwähnten Faktoren, wie Avidität etc. natürlich abgesehen. Es spricht also ein solcher Fall noch nicht unbedingt gegen die von uns vertretene Anschauung von Partialtoxinen, die sowohl in der haptophoren als auch toxophoren Gruppe verschieden sind.

Endlich glaube ich, daß sich aus dem Nachweise der Partialtoxine und Antitoxine einige Fingerzeige für die Darstellung antitoxischer Sera ergeben. Wir haben oben darauf hingewiesen, daß die Kulturfiltrate der Bakterien in Bezug auf einzelne Partialtoxine gewissen Schwankungen unterliegen dürften, daß gewisse Partialtoxine in dem einen Kulturfiltrat vorhanden sind, in dem anderen aber fehlen. Unser Bestreben wird darauf gerichtet sein müssen, antitoxische Sera darzustellen, die soweit als möglich, gegen alle Partialtoxine, die ein Bakterium produziert, Antitoxine enthalten, da wir es ja vorläufig noch nicht entscheiden können, welche Partialtoxine gerade für die krankmachende Wirkung am Menschen verantwortlich zu machen sind.

Um dies zu erreichen, werden wir zunächst die Immunisierung nicht mit dem Kulturfiltrat nur eines Stammes vornehmen dürfen, denn es wäre so möglich, daß dieses Kulturfiltrat gerade ein Partialtoxin nicht enthält, das zwar kein konstantes Sekretionsprodukt des betreffenden Bakteriums, aber dennoch, wenn es vorhanden, im stande ist, den Krankheitsprozeß wesentlich zu beeinflussen. Wir würden dann aber bei Immunisierung mit diesem Filtrat auch das entsprechende Partialanti-

toxin nicht hervorrufen, und so mit einem derartigen antitoxischen Serum in einzelnen Krankheitsfällen keine oder ungenügende Resultate erzielen. Wir werden also mit den Kulturfiltraten verschiedener Stämme immunisieren müssen. Inwieweit die Erfüllung dieser Forderung notwendig ist, wird im wesentlichen davon abhängen, wie sich die Toxinproduktion im speziellen Falle verhalten wird. Gewiß gibt es Bakterien — und zu diesen scheint der Diphtheriebacillus zu gehören — die ziemlich konstant in der Giftproduktion sind, und bei denen sich nach den bisherigen Untersuchungen der Unterschied der einzelnen Gifte auf die toxophore Gruppe beschränkt, während andere wieder bedeutende Schwankungen aufweisen werden. Bei ersteren wird natürlich ein durch Immunisierung mit einem bestimmten Toxin erzeugtes Antitoxin sich ziemlich allgemein als wirksam erweisen, trotzdem auch für diese Bakterien in einzelnen Fällen die Möglichkeit der Produktion eines seltenen auch in seiner haptophoren Gruppe verschiedenen Partialtoxins nicht von der Hand zu weisen ist. Für jene Bakterien hingegen, die weniger konstant in der Produktion ihrer Toxine sind, und deren Partialtoxine sich auch in der haptophoren Gruppe unterscheiden, wird sich die Notwendigkeit einer Immunisierung mit einer größeren Anzahl von Kulturfiltraten verschiedener Provenienz als notwendig erweisen. Aber selbst damit wird noch immer nicht die Garantie gegeben sein, auch wirklich gegen alle diese Partialtoxine hochwertige Partialantitoxine zu erzielen. Wir haben in unseren Versuchen gesehen, daß die Tiere sehr verschieden in Bezug auf die Produktion der einzelnen Partialantitoxine reagieren.

Eine Tatsache, die sich in unseren Versuchen ziemlich deutlich ausprägt, scheint, wenn sie nicht Zufall ist — und darüber müssen weitere Versuche die Entscheidung bringen — einen Weg in dieser Beziehung zu deuten. Gehen wir noch einmal die Auswertung unserer drei Immunsera durch (von dem normalen antitoxischen Pferdeserum muß ich hier natürlich absehen), so ergibt sich, daß jedes dieser Immunsera seine relativ größte Wirksamkeit stets gegen die Blutkörperchen der gleichen Tierart entfaltet.

So übertrifft das Ziegenserum in seiner Schutzkraft für Ziegenblutkörperchen die beiden anderen Immunsera um das 8—512fache an Wert, während es bei der Auswertung auf die anderen Blutkörperchen die beiden anderen Sera nur um das 1—32fache übertrifft, oder sogar hinter denselben an Wirksamkeit zurücksteht. Das Gleiche ergibt sich bei Auswertung des Kaninchenserums bezüglich der Kaninchenblutkörperchen, und des Hundeserums für die Hundebloodkörperchen. Ohne auf die mögliche Deutung dieser Tatsache des näheren einzugehen, möchte ich nur andeuten, daß sie sehr wohl in dem Wesen der Ehrlich'schen Theorie begründet erscheint. Es würde also dieser Befund dafür sprechen, die antitoxischen Sera durch Immunisierung der gleichen Tierart, die wir schützen wollen, darzustellen. Dieser Weg scheint gangbar für die Tierpathologie, nicht möglich ist er natürlich für die Serumtherapie beim Menschen. Ob wir für die menschliche Therapie statt dessen die Immunisierung von dem Menschen möglichst nahestehenden Tieren wählen sollen — und von diesem Gesichtspunkte aus wären vielleicht doch wieder die früheren Versuche v. Behrings und Kitashimas an Affen aufzunehmen — oder durch Mischung von Immunseris, die von verschiedenen Tieren stammen, in dieser Frage muß die praktische Erfahrung entscheiden.

Wie dem auch sei, die Erzeugung möglichst polyvalenter antitoxischer Heilsera gegen die verschiedenen Partialantitoxine der Krankheitserreger muß unseres Erachtens das Ziel der Serumtherapie sein, namentlich in jenen Fällen, für welche der Nachweis verschiedener Partialtoxine gelungen ist.

Wien, 18. Juli 1903.

Die Redaktion des „Centralblatts für Bakteriologie und Parasitenkunde“ richtet an die Herren Mitarbeiter die ergebene Bitte, etwaige Wünsche um Lieferung von besonderen Abdrücken ihrer Aufsätze entweder bei der Ein-sendung der Abhandlungen an die Redaktion auf das Manuskript schreiben zu wollen oder spätestens nach Empfang der ersten Korrekturabzüge direkt an den Verleger, Herrn Gustav Fischer in Jena, gelangen zu lassen.

Inhalt.

- | | |
|--|---|
| <p>Albrecht, H. u. Ghon, A., Bemerkungen zu dem Artikel von Prof. H. Bonhoff: „Zum Streit um den Meningococcus“ (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. XXXIV. No. 2. p. 143), p. 792.</p> <p>Bongert, J., Beiträge zur Biologie des Milzbrandbacillus und sein Nachweis im Kadaver der großen Haustiere. (Forts.), p. 772.</p> <p>Eisenberg, Philipp, Ueber die Anpassung der Bakterien an die Abwehrkräfte des infizierten Organismus, p. 739.</p> <p>Friedmann, Friedrich Franz, Der Schildkrötentuberkelbacillus, seine Züchtung, Biologie und Pathogenität. (Schluß), p. 793.</p> <p>Kruse, Das Verhältnis der Milchsäurebakterien zum Streptococcus lanceolatus (Pneumonicoccus, Enterococcus u. s. w.), p. 737.</p> | <p>Macfadyen, Allan and Bowland, Sydney, Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus. (Schluß.), p. 765.</p> <p>Rabinowitsch, Lydia u. Kempner, W., Die Trypanosomen in der Menschen- und Tierpathologie, sowie vergleichende Trypanosomenuntersuchungen, p. 804.</p> <p>Stafford, J., Two Distomes from Canadian Urodela, p. 822.</p> <p>Volk, Richard, Ueber die Bindung des Bakteriohämolytins an die roten Blutkörperchen, p. 843.</p> <p>Wechsberg, Friedrich, Zur Lehre von den antitoxischen Seris, p. 849.</p> <p>Wendelstadt, Ueber die Einwirkung von Glykogen auf hämolytische Vorgänge, p. 831.</p> |
|--|---|

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band XXXIV enthaltenen Arbeiten.

- Abbott, A. C.**, The adrenal gland and its active principle in their relations to cytolytins and antitoxin production. 696
- Albrecht, H. und Ghon, A.**, Bemerkungen zu dem Artikel von Prof. H. Bonhoff: Zum Streit um den Meningococcus. 792
- Argutinsky, P.**, Zur Kenntnis des Tropicparasiten (*Plasmodium praecox* Gr. et Fel.). Die Tüpfelung der Wirtszellen der Halbmonde. 144
- Ball, O., und Pettersson, A.**, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität V u. VI. 167
- —, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität VII. 445. 540
- Bandi, J.**, Beitrag zur bakteriologischen Erforschung des Gelbfiebers. 463
- Bertarelli, E.**, Ueber einen ziemlich seltenen Tuberkelputumbefund. 411
- , Untersuchungen und Beobachtungen über die Biologie und Pathogenität des *Bacillus prodigioides*. 193. 312
- Bongert, J.**, Beiträge zur Biologie des Milzbrandbacillus und sein Nachweis im Kadaver der großen Haustiere. 497. 623. 772
- Bonhoff, H.**, Studien über den Vaccineerreger I. 242. 336
- , Zum Streit um den Meningococcus. 143
- Bosc, F. J.**, Les Epithéliomas parasitaires. La clavelée et l'Epithélioma claveloux. 413. 517. 666
- Carega, A.**, Ueber die aktiven Substanzen des *Bacillus coli*. 323
- Cattarina, G.**, Ueber eine bewimperte *Micrococcus*form, welche in einer Septikämie der Kaninchen gefunden wurde. 108
- Cohn, L.**, Zur Kenntnis einiger Trematoden. 35
- Dean, G.**, A disease of the rat caused by an acid-fast bacillus. 222
- Doerr, R.**, Beitrag zum Studien des Dysenteriebacillus. 385
- Dungern v.**, Bindungsverhältnisse bei der Präzipitinreaktion. 355
- Eisenberg, P.**, Ueber die Anpassung der Bakterien an die Abwehrkräfte des infizierten Organismus. 739
- Eisenberg, P.**, Ueber die Bindungsverhältnisse zwischen Toxin und Antitoxin. 259
- Engels**, Einige Händedesinfektionsversuche nach vorheriger künstlicher Infektion der Hände mit *Micrococcus tetragenus* und *Staphylococcus pyogenes aureus*. 84
- Friedberger, E.** siehe **Pfeffer, R.**
- Friedmann, F. F.**, Der Schildkrötentuberkelbacillus, seine Züchtung, Biologie und Pathogenität. 647. 793
- Frost, W. D.**, A simple method of making collodion sacs for bacteriological work. 733
- Galli-Valerio, B.**, Sur un cas d'appendicite avex *Oxyuris vermicularis* L. et *Trichocephalus trichiurus* L. 350
- Ghedini, G.**, Untersuchungen über die Wirkung einiger Organextrakte. 721
- Ghon, A. und Sachs, M.**, Beiträge zur Kenntnis der anaeroben Bakterien des Menschen II. Zur Aetiologie des Gasbrandes. 289. 398. 481. 609
- siehe **Albrecht, H.**
- de Grandl, S.**, Beobachtungen über die Geißeln des *Tetanusbacillus*. 97
- Hansemann, v.**, Ueber säurefeste Bacillen bei *Python vesicularis*. 212
- Harris, H. F.**, A modification of the Romanowsky stain. 188
- Herzog, H.**, Die Abschwächung der Säugertuberkulosebacillen im Kaltblüterorganismus. 535. 675
- , Experimentelle Beiträge zur Formaldehyd-Wasserdampfdesinfektion. 170
- Hetsch, H.**, Weiteres zur kulturellen Differenzierung der Ruhrbacillen gegenüber ruhrähnlichen Bakterien. 580
- Hirschbruch und Schwer**, Die Cholera-diagnose mit Hilfe eines Spezialagars. 585
- siehe **Kampmann**.
- Hoke, E.**, Ueber Komplementbindung durch Orgazellen. 692
- Jensen, C. O.**, Experimentelle Untersuchungen über Krebs bei Mäusen. 28. 122

- Jochmann, G. und Moltrecht**, 20 Fälle von Bronchopneumonie bei Keuchhustenkindern, hervorgerufen durch ein influenzaartiges Stäbchen: *Bacillus pertussis* Eppendorf. 15
- Jto, S.**, Ueber die Aetiologie von „Ekiri“, einer eigentümlichen, sehr akuten, ruhrartigen, epidemischen Kinderkrankheit in Japan. 509. 659
- Kampmann, Hirschbruch und Lange**, Massenerkrankung bei Enten mit eigenartigem Diphtheriebacillenbefund der *Conjunctiva*. 214
- Kempner, W.** siehe **Rabinowitsch, L.**
- Klein, E.**, Weitere Untersuchungen über die Kleinsche tierpathogene Hefe. 224
- Köppen, A.**, Tuberkulosestudien. 6
- Kokubo, K.**, Ueber die Anfertigung und Aufbewahrung von Sporensidenfäden für Desinfektionszwecke. 725
- Kraus, R.**, Ueber ein akut wirkendes Bakterientoxin. 488
- Kruse**, Das Verhältnis der Milchsäurebakterien zum *Streptococcus lanceolatus* (*Pneumonicoccus, Enterococcus* u. s. w.) 737
- Kucharszewski, H.**, De l'influence des toxines diphtérique et tétanique sur l'hémoglobine, la morphologie et le poids spécifique du sang. 381
- Lambotte, U.**, Contribution à l'étude de l'origine de l'alexine bactéricide. 453
- Lange** siehe **Kampmann**.
- Linstow v.**, Helminthologische Beobachtungen. 526
- Löwit, M.**, Ueber Niederschlagsbildung bei der Agglutination. 156. 251
- Lord, F. T.**, *Diplococcus intracellularis meningitidis* (Weichselbaum) in the nose. Report of a case without Meningitis and review of the literature. 641
- Lucksch F.**, Ein Beitrag zur pathologischen Anatomie des Paratyphus. 113
- Macfadyen, A. and Rowland, S.**, Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus. 618. 765
- Madsen, Th.**, La constitution du poison diphtérique. 630
- Maggiora, A. und Valenti, G. L.**, Ueber eine infektiöse Krankheit beim Genus *Turdus*. 326
- Meyer, A.**, Naphtholblau als Reagens auf Bakterienfett. 578
- Moltrecht** siehe **Jochmann, G.**
- Moser, P. und Pirquet, Cl.**, Zur Agglutination der Streptokokken. 560. 714
- Müller, P. Th.**, Geht das Tetanolyisin mit den Proteïden des Serums und des Eiklars eine ungiftige Verbindung ein? 567
- , Weitere Studien über das Laktoserum. 48
- , Zur Theorie der natürlichen antibakteriellen Immunität. 458. 550. 700
- Noguehi, H.**, On the heat lability of the complements of cold-blooded animals. 283
- , On the multiplicity of the serum haemagglutinins of cold-blooded animals. 286
- Obermaier, G.**, Ueber die Trinkwasserdesinfektion mit Jod nach Vaillard. 592
- Omellanski, W.**, Beiträge zur Differentialdiagnostik einiger pathogener Bakterienarten. 1
- Otto, R.**, Weitere Beiträge zur Agglutination der Staphylokokken. 44
- Petersson, A.** siehe **Bail, O.**
- Pfeiffer, R. und Friedberger, E.**, Weitere Beiträge zur Theorie der bakteriologischen Immunität. 70
- Plek, E. P.**, Ueber den Gehalt der einzelnen Eiweißfraktionen des Serums an Choleraimmunkörpern. 556
- Pleri, G.**, Kurze Erwiderung auf Herrn Dr. Looss' Mitteilung: Weiteres über die Einwanderung der Ankylostomen von der Haut aus. 531
- v. **Pirquet, Cl.** siehe **Moser, P.**
- Presta, A.** siehe **Turró, R.**
- Prüschner**, Ueber die künstliche Immunität gegen Staphylokokken. 437
- Rabinowitsch, L. und Kempner, W.**, Die Trypanosomen in der Menschen- und Tierpathologie, sowie vergleichende Trypanosomenunterscheidungen. 804
- Rodella, A.**, Beitrag zur Frage der Bedeutung anaërober Bakterien bei Darmkrankheiten. 14
- Rowland, S.** siehe **Macfadyen, A.**
- Sachs, H.**, Ueber Differenzen der Blattbeschaffenheit in verschiedenen Lebensaltern. 686
- Sachs, M.** siehe **Ghon, A.**
- Sauerbeck, E.**, Zur Frage des Pankreas-cytolysins. 573
- Schwer siehe **Hirschbruch**.
- Segin, A.**, Ueber die Einwirkung der Bakterien auf verschiedene Zuckerarten. 202
- Siebert, C.**, Ueber das Verhalten des Loefflerschen Mäusetyphusbacillus zu dem v. Drigalski-Conradischen Nährboden. 601. 730
- Silbersteln, M.**, Beobachtungen über die Entstehung von jungen Malaria Parasiten aus älteren. 149. 225
- Stafford, J.**, Two Distomes from Canadian Urodela. 822
- Streng, O.**, Zur Züchtung der anaëroben Bakterien. 598
- Tarruella J.** siehe **Turró, R.**
- Turró, R., Tarruella, J. und Presta, A.**, Die Bierhefe bei experimentell erzeugter Streptokokken- und Staphylokokkeninfektion. 22

- Vagedes**, Zur Abhandlung von Krompecher und Zimmermann „Ueber die Virulenz der Tuberkelbacillen“ in Bd. XXXIII N. 8. dieser Zeitschrift. 507
- Valenti, G. L.** siehe **Maggiola, A.**
- Volk, B.**, Ueber die Bindung des Bakteriohämolytins an die roten Blutkörperchen. 843
- Wechsberg, F.**, Zur Lehre von den antitoxischen Seris. 849
- Wendelstadt**, Ueber die Einwirkung von Glykogen auf hämolytische Vorgänge. 831
- Wiener, E.**, Ein Apparat zur Züchtung von Mikroorganismen in beweglichen flüssigen Medien. 594
- , Weitere Bemerkungen zur Entstehung von Rattenepizootien. 406
- Wolff, A.**, Bemerkungen zu vorstehender Entgegnung. 557
- Zangger, H.**, Deutungsversuch der Eigenschaften und Wirkungsweise der Immunkörper. 428
- Ziellieczky, R.**, Antwort auf die Bemerkungen von Herrn Dr. Wolff in seiner Abhandlung „Die Differentialdiagnose des Typhusbacillus vom *Bact. coli* auf Grund der Säurebildung“ betreffend die von mir angestellten Versuche über „biochemische und differentialdiagnostische Untersuchungen einiger Bakterien mittelst Phenolphthaleinnährböden. 479
- Zschokke, F.**, Ein neuer Fall von *Dipylidium caninum* (L.) beim Menschen. 42
- Zupnik, L.**, *Bacterium muris*. 213

II. Namen- und Sachverzeichnis.

- Agglutination, Bildung der Niederschläge. 156. 251
- Alexine, Entstehung. 453
- Amphistomum dolichocotyle Cohn in Herpetodryas fuscus. 37
- Anaeroben, Gefäße für Züchtung. 598
- , Vorkommen im Darmkanal bei Darmkrankheiten. 14
- Ankylostomum americanum, Beschreibung. 526
- , Eindringen von der Haut aus. 531
- Anpassung der Bakterien an bakterizide Kräfte. 752
- Appendicitis mit *Oxyuris vermicularis* und *Trichocephalus trichiurus*. 350
- Bacillen säurefeste in *Python veticularis*. 212
- Bacillus acidi lactici*, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- des Gasbrandes, Entstehung von Schaumorganen. 613
- , Kultur und Biologie. 304
- , Morphologie und Färbung. 300
- , Tierversuche. 398. 481. 609
- , — mit Kulturfiltraten. 611
- diphtherieähnlicher bei Entenerkrankung. 214
- dysenteriae, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- , —, Impfung auf immune Tiere. 703
- , —, Isolierung und Kultur. 385
- , —, kulturelle Unterscheidung von ähnlichen Arten. 580
- , —, Verhalten gegen Serum Ekirikranker. 662
- enteritidis, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- Bacillus fluorescens liquefaciens*, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- — non liquefaciens, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- icteroides, pathogene Wirkung. 474
- lactis aërogenes, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- pertusis bei Bronchopneumonie beim Keuchhusten. 15
- pneumoniae, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- prodigiosus, Bibliographie. 321
- , —, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- , —, Pathogenität für Tiere. 196
- , —, toxische Wirkungen. 199. 312
- , —, Wirkung im Verein mit anderen Bakterien. 313
- psittacorum, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- pyocyanus, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- , —, Impfung auf immune Tiere. 701
- säurefester bei Rattenerkrankung. 222
- subtilis, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- syncyanus, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- typhi murium, Züchtung auf v. Drigalski-Conradischem Nährboden. 601. 730
- Bacterium coli commune*, aktive Substanzen. 323
- — —, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
- — —, Verhalten gegen Serum Ekirikranker. 662
- — — zur Erzeugung von Rattenepizootien. 406
- faecalis alcaligenes, Einwirkung auf Zuckerarten. 205

- Bacterium icteroides, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 — muris, systematische Stellung. 213
 — vulgare, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 — —, Impfung auf immune Tiere. 707
 Bakterien, Einwirkung auf Zuckerarten. 202
 Bakteriohämolysin, Bindung an die roten Blutkörper. 843
 Bierhefe, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 —, Wirkung auf Strepto- und Staphylokokken in Kulturen. 25
 — zur Immunisierung bei Streptokokkeninfektionen. 22. 24
 Brachycoelium hospitale Staff. in Diemycotylus viridescens. 824
 Bronchopneumonie bei Keuchhusten, Ursache der Bac. pertussis. 15

 Choleraambozeptoren, Verhalten bei der Bakteriolyse. 77
 Choleraimmunkörper im Serum. 556. 557
 Cholera vibrionen, Differentialdiagnose mit einem Spezialagar. 585
 —, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 —, Rezeptorenapparat. 76
 Cytolysine, Literatur. 576

 Diphtheriebacillen lebende für Immunisierungsversuche. 421
 —, Unterscheidung von Pseudodiphtheriebacillen auf Nährböden mit Ameisensäure. 4
 Diphtherietoxin, Wirkung auf das Blut. 381
 —, Zusammensetzung. 630
 Diplococcus intracellularis meningitidis in der Nase. 641
 Dipylidium caninum beim Menschen. 42
 Dysenterie, Literatur. 397

 Ekiri, Uebertragbarkeit. 511
 —, Verbreitung in Japan. 509
 Ekiribacillus, Agglutination. 659
 —, Isolierung. 512
 —, Morphologie und Eigenschaften. 513
 —, Verhalten gegen Menschenblutsera. 662
 —, — — Tiersera. 664
 Entenerkrankung durch einen diphtherieähnlichen Bacillus. 214
 Erythrocyten des Blutes, Empfindlichkeit. 686
 Formaldehydesinfektion, Literatur. 186
 Formaldehyd wasserdampfdesinfektion. 170

 Gasbrand, bakteriologische Befunde. 289. 398. 481. 609
 Gelbfieber, Bakteriologie. 463
 —, Serumuntersuchungen. 469
 Glykogen, Einwirkung auf hämolytische Vorgänge. 831
 Gyrocotyle amphiptyches. 531
 — medusarum v. Linst., Beschreibung. 530
 — rugosa. 531

 Hämagglutinine im Serum kaltblütiger Tiere. 286

 Händedesinfektion nach künstlicher Verunreinigung mit Eiterkokken. 84
 Hefe tierpathogene von Klein, Vorkommen von Granulomata in den infizierten Meerschweinchen. 224
 Hoplodermma mesocoelium Cohn in Dracovolans. 35
 Hydromermis, Beschreibung. 530

 Immunität, natürliche, Ursachen. 458. 550. 700
 Immunkörper, Eigenschaften und Wirkung. 428
 — gegen bakteriolytische Ambozeptoren, Bildung. 70

 Kollodiumsäcke, Anfertigungsmethode. 733
 Komplementbildung durch Orgazellen. 692
 Komplemente im Serum kaltblütiger Tiere, Verhalten gegen Hitze. 283
 Krebs bei Mäusen. 28. 122

 Laktoserum, Fällung des Kaseins. 48
 Lecithin, Vorhandensein im Blut. 688
 Liolope copulans, Kopulierung durch den Laurerschen Kanal. 39
 Luft flüssige, Apparate zur Einwirkung auf Bakterien. 765

 Malariaparasiten, Teilung. 149. 225
 Meningococcus, Historisches. 792
 —, Oberflächenhäutchen. 143
 Mermis albicans in Raupen von Agrotis orbona. 529
 — mirabilis v. Linst., Beschreibung. 527
 — nigra v. Linst., Beschreibung. 529
 — nigrescens in Forficula acanthopygia. 529

 Micrococcus agilis albus Cattar. bei Kaninchenseptikämie. 108
 — tetragenus, Einwirkung auf Zuckerarten. 205

 Milzbrand, Empfänglichkeit des Kaninchens. 445. 540
 Milzbrandbacillen, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 —, Nachweis durch Impfung. 628. 772
 —, — — Plattenkultur. 775
 —, — in Ausstrichpräparaten. 502. 623
 —, Unterscheidung von ähnlichen Arten auf Nährböden mit Ameisensäure. 5
 —, Verhalten gegen Pferde- und Ratten serum. 167
 Milzbrandmaterial, zweckmäßige Aufbewahrung. 786
 Monocacum baryurum Staff. in Necturus maculatus. 822

 Nährböden mit Ameisensäure. 1
 Naphtholblau als Reagens auf Bakterienfett. 578
 Nebennieren, Verhältnis zu Cytolysinen und Antitoxinproduktion. 696

 Organextrakte, Wirkungen. 721

- Pankreas, Literatur. 577
 Pankreascytolysin, kritische Uebersicht. 573
 Paramermis, Beschreibung. 530
 Paratyphus, pathologische Anatomie. 113
 Paratyphusbacillen, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 Pestbacillen, Unterscheidung von Bac. pseudotuberculosis rodentium auf Nährböden mit Ameisensäure. 5
 Plasmodium praecox, Tüpfelung der Blutkörperchen mit Halbmonden. 144
 Präzipitine, Bindungsverhältnisse. 355
 Pseudomermis, Beschreibung. 530
 Pyocyaneusinfektion, Serodiagnostik. 739
 Rattenepezootien, Erzeugung durch pathogene Bakterien. 406
 Rattenerkrankung durch einen säurefesten Bacillus. 222
 Romanowskysche Färbung, Literatur. 191
 — —, Modifikation. 188
 Sarcina lutea, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 Schafpocken, Entstehung. 669
 —, histologischer Befund. 415. 517
 —, Untersuchung des Virus. 524. 666
 Serum, Hämolyse und Komplemente. 691
 Sporeneidenfäden, Anfertigung und Aufbewahrung. 725
 Staphylococcus pyogenes albus, Agglutination. 45
 — — —, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 — — aureus, Agglutination. 45
 — — —, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 — — citreus, Agglutination. 44
 — — —, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 Staphylokokken, künstliche Immunität. 437
 Streptococcus lacticus Kruse, systematische Stellung. 737
 Streptokokken, Agglutination. 560. 714
 Tetanolysin, Verhalten zu den Proteiden. 567
 Tetanusbacillen, Geißeln. 97
 Tetanustoxin, Wirkung auf das Blut. 381
 Toxine, Bindung durch Antitoxine im Körper. 259
 —, Konstitution. 851
 — und Antitoxine, Literatur. 281
 Trinkwasserdesinfektion mit Jod. 592
 Trypanosomen, Einfluß auf den Organismus. 804
 —, Literatur. 816
 Tuberkelbacillen, Agglutinationsprüfung. 6
 — der Kaltblütler, Literatur. 685
 — der Säugetiere, Abschwächung in Kaltblütlern. 535. 675
 — der Schildkröte, Kultur. 647
 — —, Morphologie. 652
 — —, Säurefestigkeit. 799
 — —, Tierversuche. 654. 793
 — im Sputum in Reinkultur. 411
 —, Literatur über Agglutination. 13
 —, Virulenzunterschiede. 507
 Turdusseuche, bakteriologische Untersuchungen. 326
 Typhusbacillen, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 —, extracelluläres Toxin. 618
 —, immunisierende Eigenschaften des Zellsaftes. 768
 —, Impfung auf immune Tiere. 700
 —, intracelluläres Toxin. 620. 767
 —, Unempfindlichkeit gegen menschliches Serum. 745
 —, Unterscheidung von Coli-Bacillen auf Nährböden mit Ameisensäure. 2
 —, — — durch die Säurebildung. 479
 —, Verhalten gegen extreme Kältegrade. 622
 —, — — Serum Ekirikranker. 662
 — zur Erzeugung von Rattenepezootien. 409
 Vaccineerreger, Züchtungsversuche. 244. 336
 Vibrio Finkleri, Einwirkung auf Zuckerarten. 205
 — Metschnikowi, Impfung auf immune Tiere. 705
 — Naskin, Produktion akut wirkender Toxine. 488
 Züchtungsapparat für Bakterien in beweglichen Medien. 594

III. Verzeichnis der Abbildungen.

- Amphistomum dolichocotyle Cohn. 37
 Anaëroben, Gefäße für Züchtung. 598—600
 Apparat für Einwirkung flüssiger Luft auf Bakterien. 765. 766
 Bacillen des Gasbrandes. 616 (Taf. I—III)
 Bakterien anaërobe bei Darmkrankheiten. 14
 Blinddarm mit Trichocephalus und Oxyuris. 352. 353
 Brachycoelium hospitale Staff. 830 (Taf. Fig. 4. 5
 Cholera vibrionen, agglutinierte Haufen. 259 (Taf.) Fig. 5. 6. 7 d
 Diphtherietoxin, Kurven über Zusammensetzung. 634. 635. 639. 640
 Dysenteriebacillus, Kulturen. 397 (Taf.)
 Hoploderma mesocoelium Cohn. 35. 36
 Kollodiumsäcke, Anfertigung. 734
 Krebs bei Mäusen, Habitusbilder und Schnitte. 142 (Taf. I—IV)
 Kurven über Eintritt der makroskopischen

schen und mikroskopischen Agglutination.	564	Plasmodium praecox.	148 (Taf.)
<i>Liolope copulans</i> , Schnitte.	40	Schafpocken, Schnitte.	418. 420. 518. 519. 522. 523. 673 (Taf. I—III)
Lysin, Kurve über das Verhalten zu Erythrocyten.	845	Schüttelapparat für Bakterienzüchtung.	596
<i>Mermis mirabilis</i> v. Linst.	528	Streptokokken, Agglutination.	562. 563. 714. 715. 720 (Taf.)
— <i>nigra</i> v. Linst.	529	Tetanusbacillen, Geißeln.	100. 101
<i>Micrococcus agilis albus</i> Cattar.	110	Trypanosomen.	822 (Taf.)
Milzbrandbacillen, Kulturen.	791 (Taf. I—III)	Tuberkelbacillen der Säugetiere im Kaltblüterorganismus.	685 (Taf.)
<i>Monocaecum baryurum</i> Staff.	830 (Taf. Fig. 1—3)	— der Schildkröte.	804 (Taf.)
		Typhusbacillen, agglutinierte Haufen.	259 (Taf.) Fig. 1—4, 7a—c

**THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW**

**AN INITIAL FINE OF 25 CENTS
WILL BE ASSESSED FOR FAILURE TO RETURN
THIS BOOK ON THE DATE DUE. THE PENALTY
WILL INCREASE TO 50 CENTS ON THE FOURTH
DAY AND TO \$1.00 ON THE SEVENTH DAY
OVERDUE.**

UCD LIBRARY

DUE JUN 5 1978

NOV 7 1977 REC'D

Book Slip-15m-8,'52 (A2578s4)458.