INTEGRIBES

ARBEITEN

AUS DEM

KÖNIGLICHEN INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE ZU FRANKFURT A. M.

HERAUSGEGEBEN VON

GEH. OBER-MED.-RAT PROF. DR. P. EHRLICH

Heft 4.

(BAKTERIOLOGISCH-HYGIENISCHE ABTEILUNG: PROF. MAX NEISSER):

- M. Neisser und Guerrini, Ueber Opsonine und Leukostimulantien.
 - L. H. Marks, Fütterung von Mäusen mittelst Magensonde.
 - L. H. Marks, Fütterungsstudien an Mäusen mit einem Bacillus der Paratyphusgruppe.
- L. H. Marks, Zur Technik der Widalschen Reaktion.
- M. Neisser, Ein Abstich- und Zählapparat für Bakterienkolonien.
- T. Ernst, Ueber einen anfangs atypischen Typhusstamm.
- Eckersdorff, Kasuistische Beiträge zum Vorkommen von Bacillen der Paratyphus (Hog-Cholera)-Gruppe.
- × Siegfried Oppenheimer, Weiteres zur Schardingerschen Reduktions-
- M. Neisser, Ueber zwei Hausapparate zur Ozonisierung von Wasser.

Mit 14 Abbildungen.

SEMPER PONIS

Deutsche medicinische Wochenschri

Prof. Dr. J. Schwalbe

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1908

Arbeiten aus dem Königlichen Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. Herausgegeben von Geh. Med.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich.

Heft 1 (Aus der Abteilung für Krebsforschung): 4906. Mit 6 Tafeln. 102 S. 9 M. Inhalt: H. Apolant, Die epithelialen Geschwülste der Maus. — P. Ehrlich, Ueber ein transplantables Chondrom der Maus. — P. Ehrlich, Experimentelle Karzinomstudien an Mäusen.

Heft 2 (Aus der prüfungstechnischen Abteilung): 1907. Mit 8 Figuren. 86 S. 3 M. Inhalt: R. Otto, Die staatliche Prüfung der Heilsera.

Heft 3 (Aus der experimentell-biologischen Abteilung): 1907. Mit einer lithographischen Tafel und 4 Abbildungen. 94 S. 3 M.

Inhalt: H. Sachs und J. Bauer, Ueber das Zusammenwirken mehrerer Amboceptoren bei der Hämolyse und ihre Beziehungen zu den Komplementen. — R. Hecker, Beiträge zur Kenntnis der hämolytischen Komplemente. — W. Rickmann, Beitrag zur biologischen Eiweissdifferenzierung. — J. Bauer, Ueber die Spezifität der biologischen Eiweissdifferenzierung. — H. Sachs und J. Bauer, Ueber die Differenzierung des Eiweisses in Gemischen verschiedenei Eiweissarten.

Die Pathologie der Nebennieren und der Morbus Addisonii. Klinische und Anatomische Untersuchungen. Von Dr. Alexander Bittorf, Privatdozent und Assistent der Medizinischen Klinik zu Breslau. Preis: 4 Mark.

Ehrlichs Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen

Immunisierungsprozesse. Von Dr. Ludwig Aschoff, Prof. in Göttingen, Zusammenfassende Darstellung. Mit 1 Tafel und 16 Textabbildungen. (Abdruck aus: Zeitschrift für Allgemeine Physiologie. Herausgegeben von Dr. Max Verworn in Göttingen. I. Band, 3. Heft, 1902.) Anastatischer Neudruck der Ausgabe von 1902. 1905. Preis: 4 Mark 50 Pf.

Die Bakteriologie des Blutes bei Infektionskrankheiten. Von Dr. med

Canon, Berlin. 1905. Preis: 5 Mark, geb. 6 Mark.

Fortschritte der Medizin, No. 33 v. 20. Nov. 1905.

In dieser verdienstvollen Arbeit stellt Canon, der selbst auf dem Gebiete der Bakteriologie des Blutes erfolgreich gearbeitet hat, alle wissenswerten Forschungsergebnisse übersichtlich und kritisch zusammen. Das Buch füllt eine Lücke in der Literatur aus und verdient empfohlen zu werden.

Das Dysenterietoxin. Von Dr. Robert Doerr, K. und K. Regimentsarzt. Mit 2 Kurven im Text und 1 Tafel. 1007. Preis: 2 Mark 50 Pf.

Handbuch der experimentellen Pathologie und Pharmakologie.

Von Dr. med. **R. Heinz**, Professor an der Universität Erlangen. Erster Band. (Zwei Teile.) Mit 4 lithogr. Tafeln und 164 Textabbildungen. 1905. Preis dieses Bandes (2 Teile): 35 Mark. Zweiter Band. Erste Hälfte. Mit 81 Textabbildungen. 1906. Preis: 20 Mark.

Inhalt: I. Kapitel. Physikalische Chemie der Zelle. Salz- und Ionenwirkungen. — II. Kapitel. Aetzwirkung. Adstringierende Wirkung. Antiseptische Wirkung. — III. Kapitel. Protoplasmagiftwirkung. — IV. Kapitel. Entzündungserregung. Acria. — V. Kapitel. Blut. — VI. Kapitel. Muskelsystem. — VII. Kapitel. Herz. — VIII. Kapitel. Blutgefässsystem. — IX. Kapitel. Lymphgefässsystem. — X. Kapitel. Atmung.

Mikroskopische Geschwulstdiagnostik.

Suchung und Beurteilung der in Tumorform auftretenden Gewebswucherungen.

Für Studierende und Aerzte, besonders auch Spezialärzte. Von Prof. Dr.

Friedrich Henke in Charlottenburg-Berlin. Mit 106 grossenteils farbigen

Abbildungen. 1906. Preis: 14 Mark, geb. 15 Mark.

ARBEITEN

AUS DEM

KÖNIGLICHEN INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE ZU FRANKFURT A. M.

HERAUSGEGEBEN VON

GEH. OBER-MED.-RAT PROF. DR. P. EHRLICH

Heft 4.

(BAKTERIOLOGISCH-HYGIENISCHE ABTEILUNG: PROF. MAX NEISSER):

M. Neisser und Guerrini, Ueber Opsonine und Leukostimulantien.

L. H. Marks, Fütterung von Mäusen mittelst Magensonde.

L. H. Marks, Fütterungsstudien an Mäusen mit einem Bacillus der Paratyphusgruppe.

L. H. Marks, Zur Technik der Widalschen Reaktion.

M. Neisser, Ein Abstich- und Zählapparat für Bakterienkolonien.

T. Ernst, Ueber einen anfangs atypischen Typhusstamm.

Eckersdorff, Kasuistische Beiträge zum Vorkommen von Bacillen der Paratyphus(Hog-Cholera)-Gruppe.

Siegfried Oppenheimer, Weiteres zur Schardingerschen Reduktions-

M. Neisser, Ueber zwei Hausapparate zur Ozonisierung von Wasser.

Mit 14 Abbildungen.



JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1908

Uebersetzungsrecht vorbehalten.

Ueber Opsonine und Leukostimulantien.

Von

M. Neisser und Prof. Guerrini (aus Mailand).

A. Die Methode der Restzählung.

Seit den bekannten Studien WRIGHTS und NEUFELDS ist die Phagocytose allerorts wieder Gegenstand der Untersuchung geworden, zumal seit WRIGHT in seinem opsonischen Index einen diagnostisch und therapeutisch bedeutungsvollen Wert gefunden hat. Trotz des großen Umfanges der Literatur, für welche wir auf die neueren Zusammenstellungen 1 verweisen, sind die Grundlagen der Opsoninfrage weniger untersucht worden, als die Verhältnisse bei menschlichen Erkrankungen. Es schien deshalb nicht überflüssig, auch die bereits von anderer Seite bekannt gegebenen Grundversuche nachzuprüfen bezw. zu erweitern 2).

Die zum qualitativen und quantitativen Studium der Phagocytose angewendeten Methoden basieren alle auf der Beobachtung bezw. Zählung der in den Leukocyten liegenden Bakterien. Dazu müssen die Leukocyten klar fixiert und die in ihnen liegenden Bakterien leicht erkennbar sein. Beides ist in Versuchsreihen mit Exsudatleukocyten nicht immer zu erreichen. Wenn außerdem die Zahl der phagocytierten Keime eine gewisse Grenze überschritten hat, dann ist die Zählung schwierig und ungenau. Und doch ist es für die Gewinnung gleichmäßiger Resultate vorteilhaft, wenn die Phagocytose eine hochgradige ist, wenn also die Mehrzahl der Leukocyten sich maximal gefüllt hat.

^{1) 1.} Sauerbeck, E., Neue Tatsachen und Theorien in der Immunitätsforschung. Sonderabdr. a. Lubarsch-Ostertags Ergebnisse. Wiesbaden (Bergmann) 1907. — 2. Löhlein, Ueber A. E. Wrights Opsonine und seine therapeutischen Bestrebungen bei Infektionskrankheiten. Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 30. — 3. Rosenthal, W., Die Wrightsche Opsoninlehre und ihre klinische Verwertung zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken. Med. Klinik, 1907, No. 15. — 4. Weichardt, Jahresbericht über die Ergebnisse der Immunitätsforschung, Bd. 1 u. 2. Stuttgart (Ferd. Enke). — 5. Hektoen, L., Phagocytosis and Opsonins. Journ. of the Americ. med. Assoc., 12. May 1906. — 6. Klien, H., The opsonins in typhoid immunity. Johns Hopkins Hosp. Bull., Vol. 18, 1907. — Sobernheim im Handbuch Krehl-Marchand, I, 1908.

²⁾ Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde Oktober 1907 abgeschlossen.

Auf Grund dieser Erwägungen haben wir eine andere Methode angewendet, deren Grundlage folgende ist: Wir zählen — nach WRIGHTscher Methode — die zum Versuche gelangende Bakterienaufschwemmung, zählen ferner die zu benutzende Leukocytenemulsion, scheiden nach der Phagocytose durch Filtration die Leukocyten — und mit ihnen die phagocytierten Bakterien — von der Flüssigkeit und zählen nunmehr die in dieser leukocytenfreien Flüssigkeit vorhandenen freien, also nichtphagocytierten Bakterien. Die Zahl der ursprünglich vorhanden gewesenen Bakterien, vermindert um die Zahl der in der leukocytenfreien Flüssigkeit gefundenen Bakterien, ergibt die Summe der phagocytierten Bakterien, das Verhältnis dieser Zahl zur Zahl der verwendeten Leukocyten ergibt die durchschnittlich von jedem Leukocyten aufgenommene Bakterienmenge — die phagocytäre Zahl pro Leukocyt.

Im folgenden seien die Details dieser Methode angegeben: Schrägagarkulturen waren das Ausgangsmaterial, für deren gleichmäßige Bewachsung dadurch gesorgt wurde, daß sie mit 3—5 Tropfen einer eintägigen Bouillonkultur beimpft wurden; es wurden möglichst gleichgroße Agarflächen ausgesucht und für gleichmäßige Ausbreitung der Impftropfen gesorgt. Dadurch wurde eine ziemlich gleichmäßige Ernte erzielt. Es folgte unter Verwendung der Oese eine sorgfältige Abschwemmung mit Bouillon und Nachspülung, gelegentlich, wenn nötig, Filtration durch ein Drahtsieb oder etwas Watte. Zur Zählung nach WRIGHT diente eine Standardaufschwemmung von Kaninchenblut in physiologischer NaCl-Lösung, welche durch Zusatz einer kleinen Menge Formalin haltbar gemacht war und auf Eis aufbewahrt wurde. Ihr Gehalt an Erythrocyten wurde nach Thoma-Zeiss bestimmt und von Zeit zu Zeit kontrolliert.

Zur Bakterienzählung wurden gleiche Teile der Standardblutaufschwemmung und der zu benutzenden Bakterienemulsion energisch gemischt und davon ein Objektträger mit einer bestimmten Oese beschickt. Die gleichmäßige Ausbreitung des Tropfens geschah mit einem zweiten, schräg aufgesetzten Objektträger, dessen freies Ende mit den Fingern gefaßt wurde, während ein 20 g-Gewicht auf sein unteres Ende zur Beschwerung aufgesetzt wurde. Dadurch wurde ein gleichmäßiger Druck beim Ausstreichen ausgeübt. Die lufttrockenen Präparate wurden in gesättigter Sublimatlösung fixiert und gewöhnlich nach GRAM und mit wässerigem Eosin gefärbt. Mit starkem Immersionssystem und Netzokular geschah die Zählung (ein großes Quadrat mit 25 kleinen Quadraten); von jedem Präparate wurden an zwei verschiedenen Stellen 2 große Quadrate, von jeder Mischung wurden 3 oder 4 Präparate ausgezählt. Es wurde so die Zahl der vorhandenen Blutkörperchen und die Zahl der Bakterien bestimmt; aus diesem Verhältnis aber konnte die in 1 cmm der Bakterienaufschwemmung vorhandene absolute Bakterienmenge leicht berechnet werden, da ja die absolute Zahl der in 1 cmm der Blutaufschwemmung vorhandenen Blutkörperchen bekannt war. Hätten wir z. B. in der Standardblutaufschwemmung 2 Mill. Erythrocyten pro 1 cmm, und hätten wir in den Mischungspräparaten auf 25 Blutkörperchen 165 Bakterien gezählt, so wäre das Mischungsverhältnis gewesen 25:165=1:6,6. Unsere Bakterienaufschwemmung hätte also enthalten 2 Mill. $\times 6,6=13,2$ Mill. Bakterien in 1 cmm.

Die Leukocyten wurden stets durch Einspritzung von Aleuronat (1 Messerspitze in 10 ccm Bouillon) in die Brusthöhle von Kaninchen gewonnen. Die Kaninchen wurden 24 Stunden nach der Einspritzung aus der Femoralis entblutet und das Exsudat mit mindestens der 10-fachen Menge physiologischer NaCl-Lösung geschüttelt, zentrifugiert und so 3mal in frischer Lösung zentrifugiert, um jede Serumspur zu entfernen. Die definitive Aufschwemmung wurde dann nach Thoma-Zeiss gezählt.

Der eigentliche Versuch wurde in kleinen Reagensgläsern derart angesetzt, daß in jedem Röhrchen 1 ccm Bakterienemulsion, 1 ccm Leukocytenaufschwemmung und 1 ccm der Serumverdünnung mit Kochsalzlösung gut gemischt und für eine bestimmte Zeit (30 Minuten) bei 37° gehalten wurden. Gleichzeitig wurde eine zweite Reihe Röhrchen vorbereitet, deren jedes einen kleinen Trichter erhielt; in jeden Trichter aber wurde ein kleines Häufchen Glaswolle gesteckt, das mit 2-3 Tropfen Bouillon befeuchtet wurde. Die dem Brutschrank entnommenen Röhrchen wurden kräftig geschüttelt und ihr Inhalt durch die Glaswolle filtriert. Der weitaus größte Teil der Leukocyten bleibt dabei in der Glaswolle zurück, natürlich auch die in den Leukocyten befindlichen Bakterien. Ein einfaches Präparat aus der Glaswolleschicht zeigt das deutlich, ebenso wie ein Präparat des Filtrates erkennen läßt, daß nur ganz wenige Leukocyten, aber viel freie Bakterien das Filter passiert haben. Das Filtrat ist mehr oder weniger getrübt, je nach der Anzahl der durchpassierten Bakterien, ohne daß indessen der Trübungsgrad ein verläßlicher quantitativer Indikator für die Zahl der passierten Keime wäre, wie wir wohl anfangs geglaubt haben. Die durch das Filter passierte Flüssigkeit wird nunmehr wie die Original-Bakterienaufschwemmung zu gleichen Teilen mit der Standardblutaufschwemmung gemischt und in gleicher Weise wie beschrieben behandelt und gezählt. Bei der dann folgenden Ausrechnung muß man beachten, daß die durch das Filter passierte Flüssigkeit eine Bakterienaufschwemmung ist, welche im Gegensatz zur Original-Bakterienaufschwemmung durch die Leukocyten und das Serum bereits im Verhältnis 1:3 verdünnt war.

Es ist zweckmäßig, die erhaltenen zahlenmäßigen Werte nicht nur als "phagocytäre Zahl" auszurechnen, sondern auch das Prozentyerhältnis der phagocytierten Bakterien zu der Gesamtmenge der Bakterien anzugeben. Denn nur daraus erkennt man, ob nicht etwa alle

oder fast alle Bakterien phagocytiert werden; in diesem Falle nämlich würde die gefundene phagocytäre Zahl ein zu niedriger Wert sein können. Wären mehr Bakterien vorhanden gewesen, so wären vielleicht noch mehr phagocytiert worden.

B. Prüfung der Methode.

Die Methode ist ziemlich umständlich und erfordert recht viel Zeit; sie setzt ferner größere Mengen von Leukocyten voraus. Aus allen diesen Gründen ist sie nicht zur Bestimmung des opsonischen Index am Krankenbett geeignet, sie ist vielmehr wesentlich für Versuchsreihen, die über theoretische Punkte der Phagocytose Aufschluß geben sollen, bestimmt. Sie eignet sich auch, wie wir noch zeigen werden, um die Frage der echten Leukocytenstimulantien einerseits, der Leukocytengifte andererseits quantitativ zu studieren. Schließlich haben wir die Methode bisher ausschließlich für den Staphylococcus pyogenes aureus angewandt und wissen über die Verwendbarkeit für andere. Bakterien nichts. Natürlich waren von vornherein manche Einwände gegen die Genauigkeit der Methode zu prüfen, wenn die Methode Anwendung finden sollte.

Einmal ist es für die Genauigkeit der Zählung von großer Bedeutung, daß keine Bakterienkomplexe vorhanden sind; es muß deshalb die Bakterienemulgierung sehr sorgfältig geschehen, die Emulsion muß vor dem Gebrauch lange und kräftig geschüttelt werden. Man überzeugt sich durch ein ungefärbtes Präparat von der guten Verteilung der Bakterien, und filtriert, wenn diese nicht vorhanden ist, wiederholt durch etwas Watte. Von Einfluß ist natürlich der Zustand der Kultur, also das Verhältnis der in der Kultur vorhandenen lebenden und toten Keime; denn die toten Bakterien werden leichter phagocytiert als die lebenden. Der folgende Versuch wurde mit lebenden und mit bei 60° abgetöteten Staphylokokken und zwar einerseits in NaCl, andererseits in normalem aktivem Kaninchenserum ausgeführt.

Es wurden phagocytiert in Proz.

der bei 60° abgetöteten der lebenden Staphylokokken Staphylokokken 9,5 % 2,4 % in physiologischer NaCl-Lösung 66,3 % in Normal-Kaninchenserum

Im folgenden sind die Resultate stets als Wert der phagocytären Zahl angegeben, was, wie erwähnt, besagt, wieviel Bakterien durchschnittlich von einem Leukocyten aufgenommen werden.

Folgender Versuch wurde mit normalem aktivem Kaninchenserum einerseits, mit inaktiviertem Immunserum (Kaninchen mit unserem Staphylococcus immunisiert) andererseits angestellt. Als Kontrolle diente physiologische NaCl-Lösung.

Zahl der Leukocyten in 1 cbmm: 0,87 Mill. Zahl der lebenden bezw. bei 60° abgetöteten Staphylokokken 19,9 Mill. in 1 cbmm.

	Phagocytäre Zahlen		
	Lebende Kultur	Tote Kultur (60°)	
NaCl	0,3	2,1	
akt. Normalserum	15,1	21,1	
inakt. Immunserum	21,4	22,1	

Die Leukocyten nehmen also tote Bakterien reichlicher auf als lebende. Ebenso wurden, wie ein anderer Versuch zeigte, Staphylokokken aus einer älteren Kultur reichlicher phagocytiert, als 24-stündige Staphylokokken.

Wir verwandten stets 20-stündige Kulturen. Auf die Virulenz, die sicherlich von großem Einfluß ist, brauchten wir, da wir stets denselben Stamm benutzten, keine Rücksicht zu nehmen.

Ueber die beste Dauer der Versuchszeit gab folgender Versuch Aufschluß:

Bakterienau	ufschwemmung 14,56 M	Iill. in 1 cmm
Leukocyten		,, ,, 1 ,,
	Phagocytä	
Aufenthalt bei 37°	Norm. akt. Kaninchensen	rum physiol. NaCl-Lösung
15 Min.	8,0	0,08
30 "	15,9	0,3
60 "	15,9	3,6
120 "	16,0	4,1

Auf Grund dieses Versuches haben wir in allen Versuchen die Proben 1/2 Stunde bei 37° stehen lassen.

Das Exsudat muß möglichst frei von Blut sein; aber auch ohne direkte Gefäßverletzung kann durch Diapedese das Exsudat Erythrocyten enthalten, wie daraus hervorgeht, daß bei Einspritzung in die rechte Pleurahöhle das nicht selten auch links entstehende Exsudat gelegentlich Erythrocyten zeigt. Bei Verwendung der Wrightschen Zählmethode vermögen größere Mengen von Erythrocyten, von denen ein Teil bei der Filtration mit den freien Bakterien das Filter passiert, die Zählresultate zu beeinträchtigen. Es ließe sich diese Fehlerquelle allenfalls durch Verwendung kernhaltiger Standardblutaufschwemmung oder aber einer anderen Standardaufschwemmung (wie Hefe) ausschalten; wir haben indessen für unsere Versuche jedes irgend stärker bluthaltige Exsudat von der Verwendung ausgeschlossen.

Das Exsudat soll möglichst 24 Stunden nach der Einspritzung benutzt werden. Freilich zeigte einmal eine Untersuchung eines

24-stündigen Exsudats die phagoc. Zahl 15,

48-stündigen Exsudats die phagoc. Zahl 14, aber das 48-stündige Exsudat zeigt häufig bereits viele zerfallene Leukocyten.

10

Eine sehr gründliche Entfernung des Plasmas durch Zentrifugieren ist durchaus nötig. Die Leukocyten müssen eine normale Vitalität besitzen; deshalb ist eine Tötung der Tiere durch Chloroform oder Aether nicht angängig. Auch darf die eingespritzte Aleuronatmenge nicht so groß sein, daß schwere Atmungsstörungen der Tiere eintreten, denn asphyktische Kaninchen — an der violetten Färbung der Schnauze zwischen den Nasenlöchern erkennbar — geben unregelmäßige Resultate und sind auszuschließen.

Besonders wird man Einwände gegen die Filtration machen. Wir haben sie auch erst angewendet, als wir die Zentrifugierung als unbrauchbar erkannt hatten. Denn bei der Filtration durch gewöhnliches Filterpapier verloren wir 3 Proz. der Bakterien, bei der Zentrifugierung aber 21,6 Proz. Aber auch die Filtration durch Papier ergab, wie eben erwähnt, einen Verlust von 3 Proz., die Filtration durch Glaswolle nur einen Verlust von 0,9 Proz.

Schließlich war zu erweisen, daß es in der Tat die lebenden Leukocyten waren, welche die Bakterien aufnehmen und dadurch auf dem Filter zurückhielten. Ein einfacher Kontrollversuch mit Chinin klärte darüber auf. Wir versetzten eine Leukocytenaufschwemmung zu etwa 1 Proz. mit Chinin, setzten Staphylokokken (17,7 Millionen pro cbmm) zu und filtrierten durch Glaswolle; es fanden sich wieder 17,4 Millionen pro cbmm, was einen Verlust von weniger als 2 Proz. bedeutet.

Diesen Chinin-Kontrollversuch haben wir späterhin sehr oft gemacht auch dann speziell, wenn Immunsera zur Anwendung kamen, die ja auch agglutinierende Wirkung hätten haben können. Wir überzeugten uns auf diese Weise, daß diese Einwände gegen unsere Filtrationsmethode hinfällig sind, daß vielmehr die Differenz in der Zahl der Bakterien vor und nach der Filtration — abgesehen von minimalen Fehlergrenzen — allein auf die phagocytäre Tätigkeit der lebenden Leukocyten zu beziehen ist.

Eine Frage glaubten wir noch vor dem Beginn unseres eigentlichen Themas untersuchen zu sollen: ob nämlich für die phagocytäre Zahl das Verhältnis von Leukocyten zu Bakterien von Bedeutung sei. Wir benutzten zu diesem Zweck 3 Leukocytenaufschwemmungen, die mit physiologischer NaCl-Lösung so hergestellt waren, daß eine Aufschwemmung halb soviel, die weitere Verdünnung den 4. Teil der Leukocyten der Originalaufschwemmung enthielt. Und zwar stellten wir durch Zählung fest, daß unsere Verdünnungen die richtigen Mengen Leukocyten enthielten. (Die Zählung ergab 1—1,5 Proz. Differenz gegenüber der Berechnung.) Die benutzte Bakterienaufschwemmung war in den 3 Versuchen die gleiche. Als Serum wurde frisches aktives Kaninchenserum in gleichen Mengen verwendet.

Leukocytenaufschwemmung	Phagocytäre Zahl	⁰ / ₀ der phagocytierten Bakterien
unverdünnt	15	74 0/0
halbverdünnt	15	36 ,,
4-fach verdünnt	15	18 ,

Das Resultat des Versuches war ganz eindeutig: Die phagocytäre Zahl war in allen drei Proben 15. (Die Dezimalen sind fortgelassen.) Trotzdem also im 3. Versuch nur 18 Proz. der vorhandenen Bakterien phagocytiert waren, demnach noch ein großer Bakterienüberschuß zur Verfügung stand, wurden doch von den Leukocyten nur durchschnittlich 15 Bakterien pro Leukocyt aufgenommen, und zwar genau soviel pro Leukocyt, wie in den beiden anderen Proben, in denen 36 Proz. bezw. 74 Proz. der vorhandenen Bakterien phagocytiert wurden. Es ist das ein Beweis, daß das Phänomen der Phagocytose eine biologische Erscheinung ist und daß nicht etwa eine Art Gleichgewichtszustand zwischen der Anzahl der Bakterien und der Zahl der Leukocyten eintritt. Dieser Versuch, den wir 2 mal mit ähnlichem Erfolge gemacht haben, steht in einem gewissen Gegensatz zu den Angaben WRIGHTS, denen zufolge die Dichtigkeit der Bakterienaufschwemmung für die Ansetzung des opsonischen Versuches von wesentlicher Bedeutung sei. Aber die Versuchsverhältnisse bei dem Wrightschen Opsoninversuch und bei unseren Phagocytoseversuchen sind so verschieden (Menschenserum, Menschenleukocyten, ganz verschiedene Größenordnung der phagocytären Zahl), daß allein daraus die Verschiedenheit der Resultate begreiflich wäre. Ein unseres Erachtens aber besonders differierender Punkt ist der, daß Wright verhältnismäßig gleiche Leukocytenmengen, aber verschiedene Bakterienmengen bei gleichbleibender Serumquantität benutzt. Wir haben aber, wie erwähnt, Bakterien- und Serummengen gleich und die Leukocytenmenge verschieden gewählt. Unsere Bakterien waren also in allen 3 Proben in gleicher Weise "opsoniert", eben derart, daß sie durchschnittlich zu 15 pro Leukocyt aufgenommen wurden. Bei der Wrightschen Versuchsanordnung ist es denkbar, daß die in verschiedener Menge in das gleiche Serumquantum eingebrachten Bakterien verschieden stark "opsoniert" und demnach auch verschieden stark phagocytiert wurden.

Weiterhin haben wir uns über die Verläßlichkeit der Wrightschen Zählmethode orientiert. Da scheint es uns von Bedeutung, daß bei unserer Methode der Restzählung die Bequemlichkeit, also die Verläßlichkeit, der Zählung mit der Höhe der Phagocytose zunimmt — je größer die Phagocytose, um so geringer der nicht phagocytierte Rest. Ferner haben wir von verschiedenen Untersuchern die gleiche Bakterienaufschwemmung durchzählen lassen und dabei so geringe Differenzen ge-

Ueber Opsonine und Leukostimulantien.

funden, daß die schließliche Berechnung der phagocytären Zahl nur in den Dezimalen differiert hätte.

Schließlich haben wir eine direkte Vergleichung unserer Restzählmethode und der gewöhnlichen Zählung der intraleukocytär liegenden Bakterien vorgenommen, und zwar absichtlich in einem Falle, in dem die phagocytäre Zahl niedrig war, in dem also die Chancen für unsere Methode weniger günstig, aber für die gewöhnliche Methode vorteilhaft waren.

Phagocytäre Zahl in 2 Versuchen:

Direkte !	Zählung der intraleukocytär genden Staphylokokken	Restzählmethode
	7.2	8,2
1)	45	5,1

Ohne auf eine Diskussion der nach beiden Methoden gewonnenen Resultate einzugehen, stellen wir nur fest, daß die Differenzen keine sehr erheblichen sind.

C. Das Opsonin des Normalserums.

Wir verfügen im ganzen über 13 Einzelversuche, in denen die opsonische Kraft des normalen aktiven Kaninchenserums bestimmt wurde; sie wurden an verschiedenen Tagen angestellt und dienten häufig nur als Kontrolle für besondere Versuchsreihen. In 6 Versuchen dieser Art wurde gleichzeitig eine Kontrollprobe in NaCl-Lösung angesetzt, außerdem verfügen wir noch über einen Versuch in NaCl, zu dem ein Versuch mit normalem aktivem Serum nicht vorhanden ist.

Die Leukocytenmenge schwankte in diesen Versuchen zwischen 0,9 und 0,46 Mill. in 1 cmm. Die Bakterienmenge zwischen 19,5 und 14,6 Mill. in 1 cmm. Die phagocytären Zahlen lagen in

normalem aktiven Kaninchenserum	NaCl
zwischen 15,0 und 15,9	0,1 und 0,8
Durchschnitt 154	0,3

In einigen Versuchen haben wir das Serum des Kaninchens, von dem die Leukocyten stammten, mit dem Serum anderer normaler Kaninchen verglichen. Ein Unterschied in der phagocytären Zahl war nicht nachweisbar. Um zu sehen, bis zu welchem Verdünnungsgrad das aktive Normalserum noch opsoniert, machten wir folgenden Versuch:

Leukocyten	0,49	Mill.	in	1	cmm 1)
Bakterien	19.4	22	22	1	"

1) Im folgenden bedeutet:

Serumverdünnung	Phagocytierte Bakterien in %	Phagocytäre Zahl
1:10 davon 0,5	21,6	8,6
0,28	9,8	3,6
0,18	8,2	3,4
1:100 ,, 0,5	3,1	1,2
0,28	1,0	0,3
0,1	fast 0	0,2

Ferner haben wir einen Versuch mit Normal-Menschenserum bezw. Normal-Pferdeserum, Normal-Rinderserum und Normal-Meerschweinchenserum angestellt.

Normal-Menschenserum akt.:	L.		0,76
Level Towns of the New York	В.		30,3
	Phagocytäre	Zahl	14,2
Normal-Pferdeserum:	L.		0,68
	B.		22,9
	Phagocytäre	Zahl	15,2
	THE OUT TO	0/0	45 1)
Normal-Rinderserum:	L.	No. No.	0,9
	В.		16,4
	Phagocytäre	Zahl	15,1
End distribution of the state o		0/0	83
Normal-Meerschweinchenserum:	L.		0,68
	В.		22,9
	Phagocytäre	Zahl	15,7
		0/0	47

Diese Sera verlieren, ebenso wie Kaninchen- und Meerschweinchenserum, ihre opsonische Aktivität bei einstündiger Erhitzung auf 58%, und so waren die phagocytären Zahlen in den mit inaktiviertem Serum ausgeführten Paralleluntersuchungen der eben angeführten Versuche folgende:

Menschenserum	aktiv	14,2	inaktiv	0,2
Pferdeserum	"	15,2	"	0,7
Rinderserum	"	15,1	, ,,	0,4
Meerschweinchenserun	n "	15,7	,,	0,3
Ferner 3 inaktiv	e Kan	inchensera		0,3
				0,3
				0.4

Absorptionsversuche mit Normalserum.

Daß die Opsonine des Normalserums von den Bakterien absorbiert werden, ist leicht zu zeigen. Wenn man mit akt. Normalserum sensibilisierte Staphylokokken nach gründlichem Waschen zu den Leukocyten gibt, so ergibt die Restzählung eine starke Phagocytose, und auch Staphylokokken, die bei 60° abgetötet und dann mit akt. Normal-

L. Leukocytenmenge, ausgedrückt in Millionen pro 1 cmm

B. Bakterienmenge,

^{1) %} bedeutet im folgenden stets, daß von den vorhandenen Bakterien n % phagocytiert waren.

serum behandelt sind, zeigen die gleiche Erscheinung, nur in noch stärkerem Maße, wie ja überhaupt tote Staphylokokken stärker phagocytiert werden.

Wir erhielten folgende Zahlen:

lebende Kultur tote Kultur 14,7 $(56,9)_0$ phagocyt. Bakterien 21,2 $(50,4)_0$ phagocyt. Bakterien

(NB. Ein entsprechendes Resultat erhielten wir bei Sensibilisierung lebender und toter Staphylokokken mit inakt. Immunserum.)

Bei der Absorption gibt das Normalserum, wie ein Versuch zeigte, sein Opsonin an die Bakterien ab, es verschwindet bei der Absorption aus dem Serum. Die Absorptionsversuche sind freilich insofern etwas umständlich, als eine sehr gründliche Abzentrifugierung der Bakterien notwendig ist, wenn nicht mit Opsonin beladene Bakterien im Serum zurückbleiben sollen. Da hier aber nur große Mengen von Bakterien einen Ausschlag geben, so hat das etwaige Zurückbleiben einzelner Keime — das unvermeidbar ist — auf das Resultat keinen Einfluß.

Auffallend war bei diesen Versuchen die Erscheinung, daß es uns nicht gelang, durch Absorption das Opsonin völlig aus dem Serum zu entfernen. Nach einstündiger Absorption bei 37° durch große Mengen Bakterien enthielt ein aktives Normalserum immer noch Opsonin, so daß der Versuch die phagocytäre Zahl 3,2 ergab.

In weiterer Verfolgung dieser Erscheinung kamen wir zu folgendem Versuch: Wir versetzten ein Normalserum mit großen Mengen Bakterien, ließen eine Stunde bei 37° stehen und zentrifugierten 1¹/₂ Stunden. Die überstehende Flüssigkeit teilten wir in 2 Teile, verdünnten den einen Teil im Verhältnis 1:2, den anderen im Verhältnis 1:16 und machten damit den opsonischen Versuch nach der Restzählmethode. Das Resultat war:

Phagocytäre Zahl für das 1:2-Serum 3,6 " " 1:16-Serum 2,9

Aus äußeren Gründen konnten wir dieser interessanten Erscheinung nicht weiter nachgehen und deshalb nicht feststellen, ob im Normalserum ein schwer absorbierbares, schwach sensibilisierendes, aber reichlich vorhandenes Opsonin neben dem gewöhnlichen besteht, oder ob es sich um eine ganz andere Erscheinung (normales Serumstimulans, Abgabe eines Stimulans aus den Bakterien oder dergl.) handelt.

Eine weitere schon bekannte Erscheinung konnten wir bestätigen: das an sich thermolabile Opsonin des Normalserums geht mit den Bakterien eine Verbindung ein, welche thermostabil ist. Während also erhitztes Normalserum seine sensibilisierende Wirksamkeit verloren hat, kann man Bakterien, die mit Normalserum sensibilisiert waren, er-

hitzen, ohne daß die Phagocytose dieser Bakterien wesentlich geändert wird. Der Versuch war der folgende: Staphylokokken wurden bei 37° eine Stunde in aktivem Normalserum gehalten, dann gut zentrifugiert und gut gewaschen, darauf eine Stunde bei 58° erhitzt und nunmehr mit Leukocyten in physiologische NaCl-Lösung zusammengebracht. Eine Kontrolle wurde gleichmäßig behandelt, nur fiel die einstündige Erhitzung fort. Die erste Probe ergab die phagocytäre Zahl 12,1, die Kontrolle 15,2. Es hat also eine gewisse Abschwächung stattgefunden, zumal die durch die Hitze abgetöteten Staphylokokken ja noch leichter phagocytiert werden sollten, als die unerhitzten Staphylokokken der Kontrolle, aber trotzdem hat eine erhebliche Phagocytose stattgefunden — ein Beweis dafür, daß die mit Normalserum sensibilisierten und nachher erhitzten Bakterien noch als stark opsonisch gelten können.

Man wird sich demnach, zumal bei Berücksichtigung des p. 14 erwähnten Versuches, die Opsoninwirkung nicht so vorstellen können, als ob das Opsonin das Bindeglied zwischen Bakterien und Leukocyten sei, sondern wird annehmen müssen, daß durch das Opsonin eine besondere Veränderung des Bakteriums zustande kommt, die man sich am ehesten als Auftreten eines löslichen, vom Bakterium aus diffundierenden Stoffes verständlich machen kann.

D. Opsonine des Immunserums.

Wir haben uns zunächst davon überzeugt, daß die Leukocyten eines Immuntieres sich von den Leukocyten eines Normaltieres an sich nicht unterscheiden. Zum Versuch erzeugten wir bei einem mit unserem Staphylococcus immunisierten Kaninchen und bei einem normalen Kaninchen auf gewöhnliche Weise Exsudate und prüften die gewaschenen Leukocyten in physiologischer NaCl-Lösung, in aktivem Normalserum und in Immunserum auf ihre phagocytäre Kraft.

B. 16,4 Mill. Leukocyten des Immunkaninchens 0,64 Mill.

""Normalkaninchens 0,46 "

Leukocyten des

normale	n Kanincher	ns	Immunkaninchens	S
phagod	ytäre Zahl	0/0	phagocytäre Zahl	0/0
in Normalserum	15,2	43	15,9	62
in Immunserum	21,0	59	21,2	83
NaCl	0,2	0,5	0,2	0,7

Der Versuch zeigt nur ganz geringe Unterschiede, die noch innerhalb der Fehlergrenze liegen. Wir konnten demnach einen Unterschied zwischen den Leukocyten eines Immuntieres und eines Normaltieres nicht konstatieren.

Bei den folgenden Versuchen, deren Technik völlig die gleiche wie bei den vorhergehenden Versuchen war, haben wir zuerst die Opsonine des unverdünnten aktiven Serums — entsprechend Wright — untersucht.

17

a. 7. IX. 07. Prüfung des Serums eines normalen Kaninchenserums. Phagocytäre Zahl: 14,5 (L. 0,8 Mill., B. 14,7 Mill.).

12. IX. Intravenöse Injektion von 0,3 ccm einer 24-stünd. Bouillonkultur unseres Staphylococcus.

M. Neisser und Guerrini,

14. IX. Phagocytäre Zahl: 5,2 (L. 0,9 Mill., B. 18,4 Mill.).

0/0 25 18. IX. Phagocytare Zahl: 19,4 (L. 0,9 Mill., B. 19,5 Mill.). % 90

b. 24. IX. Prüfung des Serums eines normalen Kaninchens. Phagocytäre Zahl: 15,2 (L. 0,5 Mill., B. 18,2 Mill.).

Darauf intravenöse Einspritzung von 0,5 ccm einer 24-stünd. Staphylokokkenbouillonkultur.

25. IX. Phagocytäre Zahl: 2,6 (L. 0,5 Mill., B. 37,9 Mill.).

8. X. Phagocytäre Zahl: **16,2** (L. 0,8 Mill., B. 24,3 Mill.). 0/0 53

Danach wiederum 0,5 ccm einer 24-stünd. Bouillonkultur intravenös. 10. X. Phagocytare Zahl: 2,6 (L. 0,6 Mill., B. 37,3 Mill.).

Das starke Fallen des Wertes im unmittelbaren Anschluß an die Impfung ist die Wrightsche "negative Phase", ebenso wie das Ansteigen des Wertes in der Periode der Immunität die "positive Phase" anzeigt.

Bei der Immunisierung mit abgetöteten Staphylokokken (1 Std. 60°) haben wir auch gelegentlich diese negative Phase beobachtet.

c. 31. VIII. 2 ccm 48-stünd. Bouillonkultur (1 Stunde 60 °) intravenös eingespritzt. 3. IX. Phagocytäre Zahl: 1,2 (L. 0,8 Mill., B. 23,8 Mill.).

7. IX. Phagocytare Zahl: 14,8 (L. 0,8 Mill., B. 14,7 Mill.).

0/0 80 12. IX. Die gleiche Einspritzung wie am 31. VIII.

14. IX. Phagocytäre Zahl: 17,8 (L. 0,9 Mill., B. 18,4 Mill.). 0/0 87

18. IX. Phagocytäre Zahl: 18,6 (L. 0,9 Mill., B. 19,5 Mill.).

0/0 86 25. IX. Phagocytäre Zahl: 22,4 (L. 0,5 Mill., B. 37,9 Mill.).

8. X. Phagocytäre Zahl: 15,3 (L. 0,8 Mill., B. 24,3 Mill.).

Dieselbe Einspritzung wiederholt.

10. X. Phagocytäre Zahl: 21,1 (L. 0,6 Mill., B. 37,3 Mill.).

Eine negative Phase wurde also nur das 1. Mal beobachtet, die positive Phase ist deutlich.

Gar keine negative Phase, auch bei der 1. Einspritzung, sahen

wir bei zwei anderen, am gleichen Tage wie das eben erwähnte geimpften Kaninchen.

```
d. 31. VIII. 2 ccm einer 48-stündigen Staphylokokkenbouillonkultur
(1 Stunde 60°).
     3. IX. Phagocytäre Zahl: 14,9 (L. 0,8 Mill., B. 23,8 Mill.).
                           " 15,3 (L. 0,8 " B. 14,7 ").
```

12. IX. Dieselbe Einspritzung wiederholt. 14. IX. Phagocytäre Zahl: 17,1 (L. 0,9 Mill., B. 18,4 Mill.). 17,4 (L. 0,9 , B. 19,5 ,) 18. IX. **21,5** (L. 0,5 ", B. 32,9 ",). 25. IX.

8. X. **15,1** (L. 0,8 , B. 24,3 ,). Danach dieselbe Einspritzung.

10. X. Phagocytäre Zahl: 21,5 (L. 0,6 , B. 37,3 ,).

Es fehlt die negative Phase, die positive ist deutlich.

Ein letztes Kaninchen zeigte folgende Werte:

e. 31. VIII. 2 ccm einer 48-stünd. Staphylokokkenbouillonkultur (1 Std. 60 ° intravenös).

3. IX. Phagocytare Zahl: 15,1 (L. 0,8 Mill., B. 23,8 Mill.). " 14,9 (L. 0,8 " B. 14,7 ").

12. IX. 0,5 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur nicht erhitzt, intravenös.

14. IX. Phagocytäre Zahl: 3,8 (L. 0,9 Mill., B. 18,4 Mill.). 19,9 (L. 0,9 ,, B. 19,5 ,,). 18. IX. 15,5 (L. 0,5 ,, B. 37,9 ,,). 25. IX. 8. X. 15,6 (L. 0,8 , B. 24,3 ,,).

Danach wieder 0,5 ccm lebende Kultur intravenös. 10. X. Phagocytäre Zahl: 3,6 (L. 0,6 Mill., B. 37,3 Mill.).

Nach der Einspritzung der toten Kultur keine Erniedrigung der phagocytären Zahl, die nach jeder Einspritzung der lebenden Kultur erfolgt.

Im Anschluß an diese Versuche sei eine Beobachtung am Menschen erwähnt. Es handelt sich um das Serum eines Osteomyelitiskranken im akuten Stadium; wir verdanken das ganz frische Material dem Direktor der chirurgischen Klinik des städtischen Krankenhauses, Herrn Prof. L. Rehn. Während, wie wir gesehen hatten, das aktive Serum normaler Menschen eine phagocytäre Zahl von 14,2 zeigte, war die phagocytäre Zahl dieses Osteomyelitikerserums im aktiven Zustande nur 3.2. ein Zeichen, daß der Patient sich in der negativen Phase befand.

Wir haben noch einige weitere, wenn auch aus äußeren Gründen nicht genügend zahlreiche Versuche über die negative Phase gemacht. Einmal wäre denkbar gewesen, daß der Grund der negativen Phase nicht das Fehlen des normalen Opsonins wäre, sondern vielmehr in dem Erscheinen eines die Phagocytose hemmenden Stoffes begründet sei. Ein Versuch aber, in dem wir das aktive Normalserum mit dem aktiven Serum eines in negativer Phase befindlichen Kaninchens

Ehrlich, Arbeiten IV.

mischten, zeigte, daß die phagocytäre Zahl des aktiven Normalserums nur im Verhältnis der Verdünnung geändert wurde; das Gleiche ergab sich, wenn wir das Serum des Negativ-Phase-Kaninches inaktivierten und dann mit normalem aktiven Kaninchenserum mischten.

Schließlich haben wir zur Prüfung der Frage, ob die negative Phase spezifisch sei, einen Versuch gemacht.

f. Kaninchen vor dem Versuch: Phagocytäre Zahl: 15,4.

Danach intravenöse Injektion von 0,5 ccm Bouillonkultur von Bacterium coli.

Phagocytäre Zahl am folgenden Tage: 14,2

g. Ein anderes Kaninchen, vor dem Versuche: 15,2 Intravenöse Injektion von 0,5 ccm eintägiger Coli-Bouillonkultur. Phagocytäre Zahl am nächsten Tage: 15,2

am folgenden Tage: 15,

Das so charakteristische Absinken der phagocytären Zahl gegenüber Staphylokokken, das wir nach Einspritzung lebender Staphylokokkenkultur stets haben eintreten sehen, fehlt nach der Einspritzung lebender Colikultur.

Wir wissen wohl, daß dieser Versuch insofern unvollständig ist, als nicht erwiesen ist, daß die phagocytäre Zahl für Coli wirklich gesunken war. Immerhin gibt er einen Hinweis für die spezifische Natur der negativen Phase.

Im Gegensatz zum Opsonin des Normalserums sind die opsonischen Substanzen des Immunserums (bakteriotrope Substanzen Neufelds) bekanntlich thermostabil.

Der folgende Versuch, der mit dem unerhitzten und mit dem auf 58° (1 Stunde) erhitzten Serum eines der erwähnten Immunkaninchens angestellt wurde, zeigt die bekannte Erscheinung deutlich:

Serum aktiv Phagocytäre Zahl: 21,4 (L. 0,5 Mill. B. B. 18,3 Mill. Serum 1 Std. 58° erhitzt " " 21,1 " " "

Ein Immunserum ist also von einem Normalserum an der Thermostabilität der opsonischen Substanzen sicher zu unterscheiden; ein weiterer Unterschied liegt in der Höhe der phagocytären Zahl, die, wie die Versuche zeigen, höher ist als beim normalen Tiere. Gleichwohl wird man aus der Höhe der phagocytären Zahl, also auch aus dem Verhältnis der phagocytären Zahl beim Immuntier zur phagocytären Zahl beim Normaltier (opsonischer Index von Wright) keine direkten Schlüsse auf den Stärkegrad des Serums ziehen können. Das wird nur auf dem bei unserem quantitativen Arbeiten allein möglichen Wege der Austitrierung mittels Verdünnung des Serums möglich sein. Dementsprechend haben wir das Serum des einen Kaninchens, das unverdünnt die phagocytäre Zahl 21,6 zeigte, verdünnt und ausgewertet.

Serumverdünnung	Phagocytäre Zahl
1:10	21,6
1:50	21,3
1:100	20,6
1:500	19,0
1:1000	16,0
1:5000	11,2
1:10000	4,7
1:50000	1.8

Es zeigte sich also, daß noch das 1000-fach verdünnte Immunserum dieselbe phagocytäre Zahl ergab, wie sie das Normalserum zu haben pflegt. Und selbst das auf 10000 und sogar auf 50000 verdünnte Serum zeigt noch eine Erhöhung der phagocytären Zahl gegenüber der Phagocytose in NaCl.

Schließlich haben wir noch Sensibilisierungsversuche mit dem Immunserum angestellt. Wir ließen die Bakterien eine Stunde bei 57° in Contakt mit dem Immunserum, zentrifugierten, wuschen mit NaCl und machten dann in NaCl den opsonischen Versuch:

Das benutzte Immunserum hatte eine phagocytäre Zahl von 21,5, die sensibilisierten Bakterien ergaben die phagocytäre Zahl von 21,2 (L. 0,8, B. 22,4 Mill.).

Um aber dem Einwand zu begegnen, daß etwa noch beim Waschen zurückgebliebene Spuren freien Serums die Sensibilisierung vorgetäuscht hätten, haben wir nicht nur mit dem Vollserum, sondern auch mit dem verdünnten Immunserum sensibilisiert. In der folgenden Tabelle geben wir die phagocytären Zahlen wieder, die mit dem verdünnten Serum an sich und die durch Sensibilisierung mit dem ebenso verdünnten Serum erhalten wurden.

Serum	direkt geprüft	Staphylokokken mit der entsprechenden Serumverdünnung sensibilisiert
unverdünnt	21,2	
1:2	THE STATE OF THE S	21,3
1:1000	15,9	15,2
1:5000	11,2	7,6

Also auch mit dem 5000-fach verdünnten Immunserum ist eine hochgradige Sensibilisierung der Bakterien möglich.

Analoge Versuche wurden mit unserem Immunserum (Kaninchen) und toten (1 Stunde 60°) Staphylokokken gemacht, und zwar wurde in folgendem Versuch das volle Immunserum teils aktiv, teils inaktiv (½ Std. 58°) benutzt.

Tote Staphylokokken (1 Std. 60 °)
B. 19,2 Mill. akt. Immunserum: phagocytäre Zahl: 22,5
L. 0,5 Mill. inakt. " " " 22,1

Dieselbe Thermostabilität zeigte sich in einem Sensibilisierungsversuch, der entsprechend dem früher erwähnten Sensibilisierungsver-

such mit normalem Serum angestellt wurde; die lebenden Staphylokokken wurden also eine Stunde lang bei 37° mit Immunserum sensibilisiert, dann zentrifugiert und tüchtig gewaschen, schließlich eine Stunde auf 60° erhitzt und dann zum Versuch benutzt; die erhaltene phagocytäre Zahl war 22,4.

Außer unserem selbstgewonnenen Immunserum (Kaninchen) haben wir noch das im Handel erhältliche Antistaphylokokkenserum der Firma Ruete und Enoch in Hamburg, das vom Pferd stammt, zu Versuchen herangezogen. Als Kontrollen dienten normales aktives Pferdeserum und das gewöhnliche Diphtherieserum.

Antistaphylokokkenserum	Normal-Pferdeserum aktiv	Diphtherieserum
Verdünnung 1:10 —	15,2	
1:100 21,9	3,7	2,8
1:1000 16,3	0,4	0,4

Das Antistaphylokokkenserum ist also auch unserem Stamm gegenüber ein Immunserum.

Aus besonderen Gründen haben wir noch das ebenfalls der Fabrik Ruete-Enoch entstammende, sogenannte Deutschmann-Serum, gleichfalls vom Pferd gewonnen, zur Kontrolle herangezogen.

Verdünnung	Phagocytäre	Zahl
unverdünnt	16,1	
1:10	15,2	
1:50	6,3	
1:100	3,7	
1:1000	0,4	

Ein Sensibilisierungsversuch mit DEUTSCHMANN-Serum ergab die

Phagocytäre Zahl: 3,2.

Zu diesen Versuchen ist folgendes zu bemerken: Aus dem Sensibilisierungsversuch ergibt sich, daß keine direkte Beziehung zwischen Staphylokokken- und dem Deutschmann-Serum besteht; das Deutschmann-Serum vermag Staphylokokken nicht zu opsonieren. Aus dem 1. Versuch mit Deutschmann-Serum folgt aber, daß es gleichwohl die Phagocytose zu verstärken vermag; eine andere Versuchsanordnung ließ diese verstärkende Wirkung des Deuschmann-Serums deutlich erkennen. Wenn wir Staphylokokken mit Immunserum sensibilisierten und nach Abzentrifugieren mit Leukocyten und Deutschmann-Serum bezw. Normalserum versetzten, so mußte die verstärkende Wirkung deutlich werden.

Wir sensibilisierten die Bakterien

1) mit dem halbverdünnten

2) mit dem 5000-fach verdünnten Immunserum, und benutzten das Deutschmann-Serum bezw. Normalserum in 100- und 1000-facher Verdünnung. A. Sensibilisierung mit halbverdünntem Immunserum.

Phagocytäre Zahl bei Zusatz von Pferdeserum (1:100) 19,7 Deutschmann-Serum (1:100) 21,3

B. Sensibilisierung bei 5000-fach verdünntem Immunserum.

Phagocytäre Zahl nach Zusatz von		
aktives Normal-Pferdeserum	(1:100)	7,9
Deutschmann-Serum	(1:100)	13,0
	(1:1000)	9,9

Auf diese besondere Eigenschaft des Deutschmann-Serums werden wir noch im Abschnitt E zurückkommen.

Zum Schluß sei noch ein Protokoll mitgeteilt, das die phagocytären Zahlen des Serums eines Kaninchens während der Immunisierung zeigt. Und zwar wurde das Serum sowohl aktiv wie inaktiv und quantitativ untersucht.

		Phagocytäre Zahl			
No. Por			aktiv 15,2	inaktiv 0,3 d	ann
V	or dem Versuch		Impfung von	0,5 ccm einer	24-std.
			Bouillon	kultur intraven	ös
2 Tag	ge später		aktiv	inaktiv	
	Serumverdünnung	1:2	4,0	0,4	
		1:4	3,9		
		1:8	3,8		
		1:16	3,7		
2 Tag	ge später				
24 11 11	Serumverdünnung	1:2	12,1	3,6	
		1:4	8,2	1,1	
		1:8	6,1	1,0	
		1:16	5,0	0,4	
2 Tag	ge später			10000000000000000000000000000000000000	
	Serumverdünnung	1:2	16,7	15,9	
		1:4	16,6	15,8	
		1:8	16,4	15,7	
		1:16	16,3	15,6	

Der Versuch lehrt mancherlei: Einmal zeigt das inaktivierte Serum, und nur dieses, den Gang der Entstehung des spezifischen Immunopsonins (Bakteriotropine Neufelds). Denn am 4. Tage nach der Impfung beginnt ein thermostabiles Immunopsonin aufzutreten, das am 6. Tage bereits reichlich vorhanden ist. In dieser Zeit ist aus dem Versuch mit dem aktiven Serum nicht zu erkennen, ob ein normales oder ein immunisatorisch entstandenes Opsonin vorliegt; wird die Inaktivierung angewendet, so ist der Unterschied evident, ein normales Opsonin wäre verschwunden, ein immunisatorisch entstandenes leidet unter der Inaktivierung fast gar nicht. Am 4. Tage nach der Impfung

ist ein beträchtlicher Unterschied in den Werten des aktiven und inaktiven Serums zu konstatieren; dies ist augenscheinlich damit zu erklären, daß außer der Neuentstehung des Immunopsonins noch das normale Opsonin, das in der negativen Phase verschwunden war, wiederkehrt.

Es gelingt somit bei gleichzeitiger Untersuchung von aktivem und inaktivem Serum festzustellen:

- Daß überhaupt keine Infektion gegenüber dem betreffenden Bakterium vorliegt (normales Tier).
 Aktives Serum ergibt normale Zahl, inaktives Serum ergibt fast 0.
- 2) Daß zur Zeit der Untersuchung eine starke Durchseuchung mit dem betreffenden Bakterium stattfindet (negative Phase). Aktives Serum ergibt sehr niedrige Werte, inaktives Serum ergibt fast O.
- 3) Daß immunisatorisch entstandene Stoffe nachweisbar sind. Aktives Serum ergibt annähernd normale Werte, inaktives Serum ergibt je nach dem Zeitpunkt verschieden hohe Werte, aber stets höhere, als normales inaktives Serum.

Diese gleichzeitige Untersuchung von aktivem und inaktivem Serum würde also nicht nur die Art der Infektion, sondern auch die Periode, in welcher der Patient sich befindet, erkennen lassen.

E. Ueber Leukocytenstimulantien.

Das Wesentlichste der Neufeldschen Studien besteht bekanntlich in der Erkenntnis, daß die Immunopsonine direkt auf die Bakterien, nicht aber direkt auf die Leukocyten wirken. Daß die opsonischen Substanzen nur eine direkte Verwandtschaft zu den Bakterien, nicht aber zu den Leukocyten haben, läßt sich leicht zeigen. Wir haben Leukocyten mit inaktivem Immunserum eine Stunde in Kontakt bei 37° gelassen, zentrifugiert, gewaschen und dann in physiologischer Kochsalzlösung mit den Staphylokokken zusammen gebracht. Die resultierende phagocytäre Zahl war 0,4. Solche direkt auf die Leukocyten wirkende Stoffe hat man nach Metschnikoffschem Vorgange als Stimuline zu bezeichnen; wir nennen sie, da wir im allgemeinen mit körperfremden Stoffen gearbeitet haben, Stimulantien. Bei unserer Art der Technik war es möglich, auch diese Seite der Phagocytose bei Verwendung von Arzneistoffen etc. quantitativ zu verfolgen. Um über die in Betracht kommenden Mengenverhältnisse der zu untersuchenden Stoffe einen ungefähren Anhalt zu besitzen, schienen Vorversuche mit einfacherer Technik am Platze. Wir wählten dazu die Phagocytose von Ochsenblutkörperchen (0,5 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung in physiologischer NaCl-Lösung) durch Kaninchenleukocyten (0,5 ccm einer in der beschriebenen Weise her gestellten Aufschwemmung) unter Zusatz von einem spezifischen inaktiven Immunserum (0,2 ccm Serum eines mit Ochsenblut vorbehandelten Kaninchens). Nach einstündigem Aufenthalt der Proben bei 37° erfolgte Untersuchung im hängenden Tropfen. Aus dem Verhältnis der Zahl der Leukocyten mit Phagocytose zu der Gesamtzahl der Leukocyten erhielt man ein ungefähres Bild von den Mengenverhältnissen, in denen die einzelnen Stoffe angewendet werden mußten; und für jeden Stoff stellten wir uns auf diese Weise eine Kurve her, deren Höchstpunkt diejenige Konzentration des Stoffes zeigt, bei der uns die Phagocytose der Erythrocyten die reichlichste zu sein schien.

So lag z. B. das Maximum der Phagocytose bei Chinin. hydrochloric. (1 Proz. in Wasser mit ganz geringem HCl-Zusatz gelöst) bei der Verdünnung 1:128. Alkohol absol. bei der Verdünnung 1:512, Nucleinsäure (2 Proz.) bei 1:2, Pepton Witte (1 Proz.) bei 1:256 etc.

Unter Berücksichtigung dieser Resultate wurde nun die erste Versuchsserie so angestellt, daß zu Staphylokokken und Leukocyten (in physiologischer NaCl-Lösung) fallende Mengen der verschiedenen Stoffe zugesetzt wurden.

Z. B. Bakterienemulsion (19,6 Mill.	in 1 cmm) 1 ccm
Leukocyten (0,7 Mill.	in 1 cmm) 0,5 "
phys. NaCl-Lösung	1,0 "
Chininlösung	0,5 ,,
Chininlösung 1 ⁰ / ₀	Phagocytäre Zahl
0	0,8
verdünnt 1:30 davon 0,5	0,2
, 1:90 , 0,5	5,0
1:270 , 0.5	2,0
Nukleinsäure 2 ⁰ / ₀	
0	0,8
0,5	0,8
verdünnt 1:2 davon 0,5	5,2
1:4 , 0,5	2,2

Man ersieht, daß Chinin in der Menge von 0,5 der 30-fachen Verdünnung die phagocytäre Zahl herabsetzt, also in dieser Konzentration noch als Leukocytengift wirkt. Bei entsprechender Dosis aber zeigt sich eine deutliche und erhebliche Erhöhung der phagocytären Zahl, die bei weiterer Verdünnung wieder sinkt.

Es braucht wohl kaum betont zu werden, daß diese Zahlen keine absoluten sind, sondern nur für die gewählte Versuchsanordnung (Zeit!) gelten. Immerhin zeigen sie deutlich die zahlenmäßig festgestellte Stimulation der Leukocyten. Nur aus äußeren Gründen war es uns unmöglich, die optimalen Punkte der Wirkung der benutzten Stoffe genauer auszutitrieren.

Bei der Wichtigkeit dieser Feststellungen schien es geboten, die gleichen Versuche nicht nur in physiologischer NaCl-Lösung, sondern auch unter Bedingungen anzustellen, welche an sich zur Phagocytose führen. Es galt also die opsonische Wirkung z.B. des Normalserums durch die gefundenen Leukostimulantien zu erhöhen.

1. Versuch.		
Staphylokokken (19,6	Mill.) 1,0	
akt. Normalserum	1,0	
Leukocyten (0,9 Mill.	in 1 cmm) 0,5	
Chininlösung	0,5	
Chininlösung 1 %	Phagocytare 2	Zahl
0	15,0	
1:30 dayon 0,5	4,7	
1:90 ,, 0,5	19,6	
1:270 , 0,5	16,5	

Der gleiche Versuch mit 2-proz. Nucleinsäure L. 0,5 Mill. B. 22,5 Mill.

Es zeigt sich das gleiche Phänomen: Chinin in zu großer Dosis setzt die phagocytäre Zahl herab, in richtiger Menge erhöht es, ebenso wie die Nucleinsäure, die phagocytäre Zahl um etwa 25 Proz.

Das gleiche Resultat zeigt sich bei Anwendung von Immunserum.

	Staph Leuk	nylokokken 87,3 Mill. in 1 cmm
plus	Immunserum	Phagocytäre Zahl 21,5
plus	Immunserum	plus Chinin 1 % 1:90 davon 0,5 25,9
plus	Immunserum	plus Nucleinsäure 2 % 1:2 davon 0,5 26,1

Und schließlich wurde der gleiche Versuch mit inaktiviertem, also unwirksamem Normalserum ausgeführt.

L. 0,85 Mill.	B. 22,4 Mill. in 1 cmm
Chinin 1%	Phagocytäre Zahl
verdünnt 1:30 davon 0,5	0,2
" 1:90 " 0 ,5	5,2
" 1:270 $"$ 0,5	2,1
" 1:270 " 0,5 Nucleinsäure 2 %	
0,5	0,8
verdünnt 1:2 davon 0,5	5,3
, 1:4, 0.5	2,2

Aus besonderen Gründen schien es uns noch wesentlich, diese Versuche mit sensibilisierten, wenn möglich schwach sensibilisierten Staphylokokken zu wiederholen. Wir 'haben deshalb in gewöhnlicher Weise Staphylokokken mit unserem Immunserum — aber in 5000-facher Verdünnung angewendet — bei 37° eine Stunde in Kontakt gelassen, dann mehrmals zentrifugiert und gewaschen. Auf diese Weise wurde eine

Reihe von Versuchen derart angestellt, daß 1,0 ccm Bakterien + 0,5 ccm Leukocyten + 0,5 ccm der zu untersuchenden Lösung gemischt und in gewöhnlicher Weise untersucht wurden.

Chinin. hydrochlor. 1 % B. 22,7 L. 0,65	Phagocytäre Zahl
	7,6
1:30 davon 0,5	0,2
1:90 " 0,5	12,3
1:270 ,, 0,5	9,2
Nucleinsäure 2 % B. 22,5	
L. 0,64	
0	7,2
1:2 davon 0,5	12,0
1:4 , 0.5	9,0

Am selben Tage wurde ein Versuch mit folgenden 3 Stoffen gemacht:

Alkohol absol. B. 22,6		
L. 0.54		
Konzentration	Phagocytäre	Zahl
0	7,2	
1:300 davon 0,5	2,1	
1:600 " $0,5$	13,2	
1:900 " 0,5	11,1	
Jodkalium 1:1000 ,, 0,5	12,5	
1:1500 " 0,5	9,7	
Staphylolysin (das bekanntlich im Leuk	ocidin	
ein starkes Leukocytengift besitzt)		-
1: 500 davon 0,5	12,1	
1:1000 " 0,5	9,1	
Ferner: Pepton Witte 1 % L. 0,7		
B. 22,5		
0	7,1	
1:200 davon 0,5	3,1	
1:400 " 0.5	16,1	
1:800 ,, 0,5	10,4	

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß mit Opsonin beladene Staphylokokken von den Leukocyten reichlicher bei gleichzeitiger Anwesenheit von Leukostimulantien aufgenommen wurden; und diese Leukostimulation findet sich sowohl dem Normal- wie dem Immunopsonin gegenüber, sie ist auch ohne jedes Opsonin nachweisbar.

Ordnen wir unsere Leukostimulantien nach dem Höhepunkt der phagocytären Zahl, den wir damit erzielt haben, so steht an der Spitze das Pepton, das in der Konzentration 1:160 000 eine Erhöhung der phagocytären Zahl von 7,1 auf 16,1 bewirkt hat. Man wird dabei an die Wirkung der Verdauung denken, die, wie aus den Versuchen zu schließen ist, eine direkte Leukostimulation bewirkt.

Nicht ohne Interesse ist auch der Staphylolysinversuch; er zeigt

daß auch die bakteriellen Leukocytengifte in entsprechender Dosis Leukostimulantien sind, und es wäre interessant, das Tuberkulin nach dieser Richtung zu untersuchen 1). Wer in der Phagocytose einen Heilungsvorgang infolge Eliminierung der Krankheitserreger sieht, wird in unseren Versuchen die experimentelle Stütze für die Anschauung finden, daß Bakterien durch die leukostimulierende Eigenschaft ihrer Produkte zu ihrer eigenen Eliminierung und Zerstörung beitragen.

Im Zusammenhang mit diesen Versuchen steht auch der p. 20 erwähnte Versuch mit dem Deutschmann-Serum. Daß das Deutschmann-Serum kein Staphylokokkenopsonin enthält, haben wir gezeigt, aber andererseits festgestellt, daß es zu den Leukostimulantien gehört. Es liegt auf Grund unserer Nucleinsäureversuche nahe, auch die Wirkung des Deutschmann-Serums auf Nucleine zu beziehen; denn es wird ja bekanntlich von Pferden gewonnen, die kurze Zeit, nachdem ihnen enorme Mengen von Hefe einverleibt sind, zur Ader gelassen werden. Es wäre dies die erste plausible Erklärung für die nach einer Reihe von Berichten vorhandene günstige Wirkung des Deutschmann-Serums.

Unsere Versuche über Leukostimulation lassen an eine kombinierte Therapie denken, bei der spezifische Sera und gleichzeitig Leukostimulantien in Anwendung kommen.

Zusammenfassung.

A. B. Zur Methode.

1) Für quantitative experimentelle Untersuchungen der Opsoninfrage eignet sich für Staphylokokken unsere Methode der "Restzählung".

2) Tote Staphylokokken werden in Kochsalzlösung, in Normalserum und in Immunserum mehr phagocytiert, als lebende Staphylokokken, ebenso wie ältere Kulturen mehr phagocytiert werden, als 24-stündige Kulturen.

3) Bei unserer Versuchsanordnung ist in 30 Minuten die Phagocytose im wesentlichen beendet.

4) Durch unsere Chininkontrollen wurde gezeigt, daß die Vitalität der Leukocyten ausschlaggebend für das Verschwinden der Bakterien aus dem Filtrat war.

5) Bei gleichbleibender Bakterien- und Serummenge kann die Zahl der Leukocyten um das 4-fache vermindert werden, ohne daß die phagocytäre Zahl sich ändert.

6) Die Wrightsche Methode der Bakterienzählung ist bei einiger Uebung sehr verläßlich.

- 7) Ein Vergleich zwischen unserer Restzählung und der direkten Zählung der phagocytierten Bakterien ergab keine erheblichen Differenzen.
 - C. Normalopsonine.
- 1) 13 Sera von normalen Kaninchen zeigten in aktivem Zustande Werte von 15,0—15,9.
- 2) 6 Kontrollversuche in physiologischer NaCl-Lösung die Zahlen 0,1—0,8.
- 3) Bei 20-facher Verdünnung sinkt die phagocytäre Zahl des Normalserums auf 8,6 bei 200-facher Verdünnung auf 1,2 bei 400-facher Verdünnung ist ein höherer Wert als in Kochsalzlösung nicht mehr nachweisbar.
- 4) Die untersuchten Sera von Mensch, Pferd, Rind, Meerschweinchen zeigten Werte von 14,2—15,7.
 - 5) Inaktiviert zeigten dieselben Sera einen Wert von 0,2-0,7.
- 6) Durch Absorption mit lebenden oder toten Staphylokokken verschwindet das Opsonin aus dem Normalserum bis auf einen Rest, der nicht absorbierbar zu sein scheint. Dieser Restkörper scheint reichlich vorhanden zu sein und ist vielleicht kein Opsonin, sondern ein Stimulans.
- 7) Die zur Absorption verwendeten Bakterien sind opsoniert und bleiben es, auch wenn sie nach der Sensibilisierung auf 58° (1 Stunde) erhitzt werden. Die durch das Opsonin gesetzte Veränderung ist also im Gegensatze zu dem diese Veränderung bewirkenden Normalopsonin selbst thermostabil.
 - D. Immunopsonine (Bakteriotropine Neufelds).
 - 1) Die Opsonine des Immunserums sind thermostabil.
- 2) Ein hochwertiges Immunserum zeigt eine höhere phagocytäre Zahl, als ein Normalserum.
- 3) Die Wertigkeit eines Immunserums läßt sich aber nicht aus dem Werte der phagocytären Zahl des unverdünnten Serums, sondern nur durch Austitrieren des Serums mittelst der Verdünnung erkennen.
- 4) Noch mit 1000- und mit 5000-fach verdünntem Immunserum war eine starke Sensibilisierung möglich.
- 5) Die gleichen Versuche waren mit bei 60° (1 Stunde) abgetöteten Staphylokokken möglich.
- 6) Das im Handel befindliche Staphylokokkenserum erwies sich als spezifisch opsonierend.
- 7) Das Serum von Deutschmann hatte ebenfalls eine die phagocytäre Zahl steigernde Kraft, hatte aber keine spezifische Affinität zu den Staphylokokken. Seine opsonische Wirkung muß andere, noch zu besprechende Ursachen haben.
- 8) Aus dem Vergleiche der phagocytären Zahlen des aktiven und des inaktiven Serums läßt sich nicht nur die Art der Infektion er-

¹⁾ Zusatz während der Korrektur: Calmette berichtet über solche Versuche (Compt. rend. de la soc. de biol., 1907).

kennen, sondern auch ersehen, ob zur Zeit der Untersuchung die "negative Phase" besteht, oder ob bereits immunisatorische Reaktionen ein-

gesetzt haben.

9) Nach intravenöser Einspritzung lebender Staphylokokken haben wir in den folgenden Tagen stets eine sehr deutliche "negative Phase" beobachtet. Nach Einspritzung lebender Colikultur haben wir keine negative Phase gegenüber Staphylokokken beobachtet. Bei Injektion toter Staphylokokken waren die Ergebnisse unregelmäßig. Bei einem an akuter Osteomyelitis leidenden Menschen haben wir gleichfalls eine außerordentlich geringe phagocytäre Zahl beobachtet.

E. Leukostimulantien.

1) Eine Reihe von Stoffen, die in großer Dosis Gifte für die Leukocyten sind, vermögen in entsprechend geringer Dosis die phagocytäre

Kraft der Leukocyten zu stimulieren.

2) Auf diese Weise läßt sich die phagocytäre Zahl sowohl in physiologischer NaCl-Lösung, wie in aktivem Normalserum, wie in Immunserum, wie auch schließlich gegenüber sensibilisierten Bakterien erheblich steigern.

3) Zu diesen Leukostimulantien gehören z. B. das Pepton (Ver-

dauung!), die Nucleinsäure, das Chinin, das Jodkalium etc.

4) Die in vitro nachweisbare stimulierende Wirkung des Deutschmann-Serums ist wohl auf den Nucleingehalt zu beziehen.

Fütterung von Mäusen mittelst Magensonde¹).

Von

Dr. Lewis Hart Marks (aus New Orleans), früherem Assistenten der Abteilung.

Hierzu 4 Abbildungen.

¹⁾ Eine entsprechende Arbeit habe ich im "Journal of experimental medicine" Vol. 10, No. 1, Januar 1908, New York, in englischer Sprache erscheinen lassen.

Für viele experimentelle Zwecke ist es wichtig, Mäuse mit bestimmten Quantitäten von Substanzen zu füttern. Die bisher in Betracht kommende Methode der Verabreichung von gewogenen Mengen

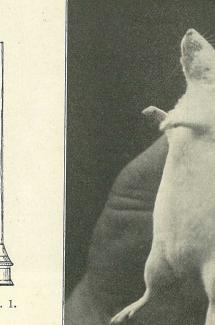


Fig. 1.

Fig. 2.

Cakes, mit welchen die Substrate vermengt sind, welche bekanntlich von Ehrlich stammt (Deutsche med. Wochenschr., 1891, p. 976), reicht für die meisten Fälle gewiß völlig aus, ist aber natürlich von dem Appetit der Tiere abhängig. Ich habe nun die direkte Magensondierung aus-

probiert und mich davon überzeugt, daß bei geeignetem Instrumentarium eine sehr geringe Uebung erforderlich ist, um ganze Serien von Mäusen intrastomachal in kurzer Zeit zu füttern; es ist dabei ein genaues quantitatives Arbeiten möglich, da die Mäuse nicht vomieren.

Die eigentliche Magensonde (cf. Fig. 1) besteht aus einem ganz feinen Seidenkatheter, etwa von der Art der Ureterenkatheter, 6½ cm



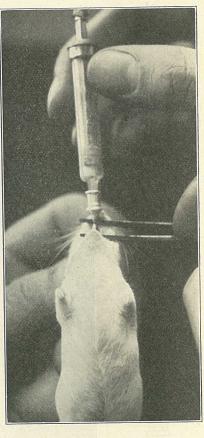


Fig. 3.

Fig. 4.

lang und an einem Ende mit einem Kanülenansatz versehen, welcher auf das untere Ende einer gewöhnlichen Pravaz-Spritze paßt. Das freie Ende der Magensonde ist abgerundet, um Verletzungen zu vermeiden. (F. und M. Lautenschläger, Frankfurt a. M.) Die Katheter sind lange gebrauchsfähig; sie werden zweckmäßig nach jeder Benutzung mit Alkohol durchgespült.

Zur Sondierung muß die Maus von einem Assistenten an der losen Haut des Kopfes und dem Schwanz gehalten und so gerade gerichtet werden. Dann wird eine leichte Pinzette geschlossen zwischen die Kiefer eingeführt und durch Oeffnen der Pinzette das Maul mäßig weit geöffnet. Die mit Wasser angefeuchtete Magensonde wird in der Mitte gefaßt und seitlich neben der Zunge mit ganz leichtem Druck nach hinten eingeführt; sie gleitet gewöhnlich sofort in die Speiseröhre, eine Verirrung in die Luftröhre ist uns niemals vorgekommen. Wenn die Sonde genügend tief eingeführt ist, wird die Spritze gefüllt, angesetzt, entleert, mit etwas Kochsalzlösung nachgefüllt, wieder angesetzt und wieder entleert; danach wird die Sonde herausgezogen. Man kann leicht 1—2 ccm Flüssigkeit einspritzen und sieht bei genügender Menge deutliche Vorwölbung des Magens (vgl. Fig. 2, 3, 4).

Anwendung bei einigen Stoffen.

Im folgenden seien einige Stoffe angeführt, deren wir zu bestimmten Versuchen bedurften. Als Maximumdosis ist diejenige Menge anzusehen, die bei einer Anzahl von Mäusen (17—25 g) noch gegeben werden konnte, ohne daß je der Tod eintrat; die letale Dosis ist die sicher tödliche.

	Calomel (in Suspension)	Letale Dosis	0,005 g	
		Maximale Dosis		
	Salzsäure	Let. D.		einer 6-proz.
			0,0 00111	Lösung
		Max. D.	0.5 ccm	einer 5-proz.
			0,0 00111	Lösung
	Chin. hydrochlor. in 3% HCl	Let. D.	0,1	2004115
	70	Max. D.	0,08	
	Jodkalium	Let. D.	0,03	
		Max. D.	0,01	
	Natr. salicyl.	Let. D.	0,035	
		Max. D.	0,02	
	Natriumsulfit	Let. D.	0,2	
		Max. D.	0,09	
	Natriumsulfat	Let. D.	0,2	
		Max. D.	0,08	
	Magnesiumsulfat	Let. D.	0,4	
		Max. D.	0,2	
	Antipyrin	Let. D.	0,04	
		Max. D.	0,01	
	Sublimat	Let. D.	0,0007	
		Max. D.	0,0004	
	Strychnin	Let. D.	0,00005	
		Max. D.	0,00003	
	Paramidophenylarsinsaures	Let. D.	0,04	
	Natrium (Atoxyl)	Max. D.	0,02	
	Acetyl-paramidophenyl-	Let. D.	0,3	
	arsinsaures Natrium	Max. D.	0,1	
1	rlich, Arbeiten IV.			3

34 Lewis Hart Marks, Fütterung von Mäusen mittelst Magensonde.

Morphin. hydrochlor.	Let. D.	0,02
	Max. D.	0,006
Kupfersulfat	Lat. D.	0,005
	Max. D.	0,002
Arsenigsaur. Na.	Let. D.	0,0005
Particular designation of the second	Max. D.	0,00025
Alkohol absol.	Let. D.	1 ccm 20-proz. Lösung pro
		20 g Maus
	Max. D.	1 ccm 14-proz. Lösung pro
		20 g Maus
Sicher einschläfernde Dos.	1 ccm 13-	proz. Lösung pro 20 g Maus

Fütterungsstudien an Mäusen mit einem Bacillus der Paratyphusgruppe.

Von

Dr. Lewis H. Marks (aus New-Orleans), früherem Assistenten der Abteilung.

Im weiteren Verlaufe der seit Jahren fortgesetzten Studien über die Bakterien der Paratyphusgruppe 1) schien es zweckmäßig, an einem größeren Tiermateriale Fütterungsversuche anzustellen; denn es gibt nicht viele Bakterienarten, mit denen in gleich bequemer Weise zu arbeiten ist, die mit gleicher Regelmäßigkeit bei dieser Art der Einverleibung die Mäuse töten und so leicht im Kadaver zu identifizieren sind. Dazu kommt, daß die gefütterten Tiere erst nach einer mehrtägigen Inkubation sterben unter Erscheinungen — wie Diarrhöe, Hämorrhagien im Darme, sogar mit Darmperforationen, wie wir beobachten konnten — die an den menschlichen Typhus erinnern. Und auch das immer noch ungeklärte Inkubationsstadium schien sich bei der Verfütterung dieser Bakterienart gut studieren zu lassen.

Als Versuchsobjekte dienten ausschließlich weiße Mäuse, die zu je 4 in einem Glase saßen. Ein besonderes Registrier- und Wartesystem war nötig, um bei der sehr großen Zahl von Mäusen (mehrere Hundert) und bei der langen Beobachtungszeit der einzelnen Tiere vor komplizierenden Epizootien, vor Verwechselungen etc. etc. genügend geschützt zu sein. Der weitaus größte Teil der Versuche ging darauf hinaus, eine aktive Immunisierung der Mäuse zu versuchen, um sie so gegen den Tod durch Verfütterung zu schützen. Das Resultat dieser sehr zeitraubenden, über 3/4 Jahre fortgesetzten Versuche läßt sich in die wenigen Worte zusammenfassen, daß es uns bisher auf keinem Wege gelungen ist, einen dauernden spezifischen Schutz gegen den Tod durch Fütterung zu erzielen. Wohl vermag eine intensive Vorbehandlung den Tod um Tage hinauszuschieben, aber mehr gelingt nicht, und auch dieses Resultat ist selten. Wir haben dabei so ziemlich alle in Betracht kommenden Arten der aktiven Immunisierung angewendet, die subkutane und intraperitoneale Einspritzung von toten Kulturen in den verschiedensten Intervallen, die Fütterung

¹⁾ Smidt, H., Zur Charakterisierung der Hog-Choleragruppe. Centralbl. f. Bakt., 1905, Bd. 38. — Ккамеринг, Münch. med. Wochenschr., 1905, No. 28. — Вöнме, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 52, 1905. — Neisser, M., Centralbl. f. Bakt., 1906, Ref. Beiheft, Bd. 38.

mit toten Kulturen in größten Mengen und lange Zeit hindurch, und haben dabei die Art der Abtötung nach den verschiedensten und schonendsten Verfahren variiert. Wir haben ferner mit stark verdünnten lebenden Kulturen vorgefüttert, in der Regel mit demselben negativen Resultate; die subkutane und intraperitoneale Einspritzung lebender Kulturen war unmöglich, weil noch ½100000 ccm unserer Kultur unter die Haut gespritzt die Tiere, wenn auch erst nach 10 Tagen, tötete. Von diesen Versuchen, die sich auch auf die Aggressinimmunisierung erstreckten, seien nur einige Protokolle angeführt.

Tabelle I. Immunisierungsversuch.

Maus No.	. 154	Art des Impfstoffes	Dosis	Art der Applikation
1. Tag		1 Agarkultur in 6 ccm NaCl 1 Stunde bei 65°	1,0 ccm	subkutan
1 Tag sp 1 ", 5 Tage	päter "	do. do. 1 Agarkultur in 6 ccm NaCl 1 Stunde bei 65 °	1,0 ,,	", intraperitoneal
4 ", 9 ", 5 ", 6 ".	"	do. do. lebende Bouillonkultur	1/2 ", 1/2 ",	gefüttert
6 ,,	"	gestorben mit typischem Befunde		Boranos

Tabelle II. Immunisierungsversuch.

Tabelle III. Immunisierungsversuch.

Maus No. 57	Art des Impfstoffes	Dosis	Art der Applikation
1. Tag 7 Tage später 7 " " 10 ", " 17 ,, "	do. 48-stündige Agarkultur in 6 ccm NaCl 1 Stunde bei 65° 1 Massenkultur = 12 Agarkulturen in 12 ccm NaCl 1 Stunde bei 60°	0,3 ,, 0,3 ,, ¹ / ₂ Oese	intraperitoneal ,,, ,, ,, intrastomachal
1 Tag ,, 2 Tage ,, 1 Tag ,, 2 Tage ,, 4 ,, ,,	do. do. do. do. lebende Bouillonkultur gestorben mit typischem Befunde	1 ", 1 ", 1 ",	,, ,, gefüttert

Ein paar Vorfragen waren zunächst zu beantworten, die für die ganze Versuchsanordnung von Bedeutung waren. Einmal war zu untersuchen, ob sich gesunde Mäuse, mit kranken in demselben Glase sitzend, spontan infizieren. Wir haben das in einer Reihe von besonderen Versuchen niemals beobachtet, auch nicht dann, wenn eine gesunde Maus in das ungereinigte Glas einer kranken Maus gesetzt wurde. Die Gefahr also, die bei einem so großen Betriebe trotz aller Aufsicht möglich erschien, daß nämlich die Infektion zu einem anderen Termin als bei der experimentellen Fütterung erfolgte, brauchten wir nicht zu fürchten. Dagegen fiel es uns auf, mit welcher Begierde und Geschicklichkeit viele Mäuse Fliegen fangen und verzehren. Wenn die Fliegen sich vorher infiziert hatten, konnte damit eine Fehlerquelle für unsere Versuche gegeben sein. Und in der Tat ließ sich dieser Infektionsweg nachweisen. Wir gaben Fliegen in besonderer Versuchsanordnung Brot, das mit unserem Stamm N (dem Versuchsstamm) getränkt war, entfernten am nächsten Tage das Brot und ließen die Fliegen 12 Tage lang mit anderem Futter in dem Gefäß, ohne daß sie noch einmal mit N gefüttert wurden. Am 12. Tage gaben wir einer Maus 3 Fliegen in ihr Glas, die auch bald verzehrt wurden. Die Maus starb in typischer Zeit mit typischem bakteriologischen Befunde. Wir waren deshalb auf Vertilgung der Fliegen besonders bedacht und ließen auch für die Mäusegläser Deckel mit besonders dichtem Geflecht herstellen. Uebrigens gelang uns dieser Fliegenversuch nur das eine Mal; und daß unsere Laboratoriumsfliegen nicht infiziert waren, lehrte die Verfütterung von 76 Laboratoriumsfliegen an 5 Mäuse, die sämtlich gesund blieben. Anderes Ungeziefer unserer Mäuse, wie Flöhe, brauchten wir nicht zu berücksichtigen, da nichts sichtbar war.

Der von uns benutzte Stamm N ist ein sogenannter Schweinepeststamm, also seinerzeit aus dem Schwein gezüchtet, mit allen morphologischen und kulturellen Merkmalen der Bacillen der Paratyphusgruppe. Sein agglutinatives Verhalten ist mehrfach beschrieben worden. Der Stamm hat seine Virulenz durch Jahre hindurch gut erhalten und es genügen wenige Mäusepassagen, um ihn wieder vollvirulent zu machen. Wie erwähnt, tötete 1:100000 ccm gewöhnlich in 10 Tagen.

Zur Fütterung wurden im allgemeinen 24-stündige Bouillonkulturen benutzt, mit denen Brotstücke reichlich getränkt wurden. Die Mäuse, zu je 4 in einem Glas, blieben 16 Stunden ohne Nahrung und erhielten dann nur diese Brotstückchen. Am nächsten Tage wurden sie in neue sterile Gläser umgesetzt und in gewöhnlicher Weise gefüttert. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle gingen die Tiere zwischen dem 7. und 10. Tage nach der Fütterung unter Diarrhöe ein, die Sektion zeigte hyperämischen Darm mit Hämorrhagien, ganz selten auch Perforationen, gelegentlich kleinste Herde in der Leber, mäßig große Milz. Eine Oese Herzblut auf Endo-Agar ausgestrichen, ergab stets reichlich Rein-

kulturen des verfütterten Stammes, ebenso eine Oese des Dünndarminhalts, während, wie die vielen Kontrollen zeigten, der Dünndarminhalt der normalen Maus fast immer steril ist.

Die Tiere sind nach der Fütterung bis etwa 2 Tage vor dem Tode anscheinend völlig gesund, und selbst von einem erfahrenen Kenner dieser Tiere nicht von einer normalen Maus zu unterscheiden. Auch die Temperaturmessung, die ich für Mäuse erprobt hatte, gibt keinen Aufschluß. Erst durchschnittlich vom 6. Tage an beginnt die erkennbare Krankheit, das Verkleben eines Auges, dann auch des anderen, das gesträubte Fell, die septische Haltung. Schlachtet man aber eine gefütterte Maus am 3. und 4. Tage, an dem sie also noch völlig gesund erscheint, und überträgt man das Herzblut mittels Kapillare in ein Conradisches Gallenröhrchen, von dem am nächsten oder übernächsten Tage eine Endo-Platte ausgestrichen wird, so ist der Nachweis der verfütterten Bakterien häufig zu dieser Zeit im Herzblut leicht möglich. Untersucht man gleichzeitig den Magenund Darminhalt, speziell den Inhalt des Dünndarms mittels Endo-Platten, so findet man die verfütterten Bacillen in den ersten Tagen nicht wieder, die erst reichlicher auftreten, wenn die Maus bereits einen kranken Eindruck macht.

Wir haben auf diese Weise bei einer großen Zahl von gefütterten Mäusen den Nachweis der im Herzblut zirkulierenden Bakterien führen können, zu einer Zeit, als die Mäuse noch völlig gesund erschienen und mehrere Tage vor dem Tode der gleichzeitig gefütterten Kontrollen. Ein Beispiel zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

Die Häufigkeit des Vorkommens im Herzblut und Dünndarm.

Serie C. 10 Mäuse gleichmäßig gefüttert am 25. Mai 1907.

Maus No.		getöt		t Chl im	oroform	Herzblut	Dünn- darm	Maus No.	Kontrollen: gestorben am
274 259 252 273 255 270	1. 2. 3. 4. 5. 6.	Tag	nach	der]	Fütterung " " " " " "	steril	steril negativ positiv	271 276 277 275	7. Tage 7. " 9. " 9. "

Das septische Aussehen der Mäuse fällt also nicht mit dem Beginn der Sepsis zusammen, sondern folgt ihr immer erst einige Tage; die reichliche Vegetation im Darmkanal, zumal im Dünndarm, ist nicht die Ursache der Sepsis, sondern deren Folge. Denn es sind bereits Bacillen im Herzblut nachweisbar, wenn der Dünndarm noch steril ist und wenn weder im Magen noch in den anderen Darmabschnitten die verfütterten Bakterien nachweisbar sind. Ob im Verlauf des septischen Prozesses die Bacillen in den Darm ausgeschieden

werden — wobei man natürlich an die Galle denken wird — oder ob die im Darm zwar nicht nachweisbaren, aber doch spärlich vorhandenen Bacillen zur Wucherung erst dann kommen, wenn der Organismus durch die Sepsis seiner Abwehrkräfte diesem Bacillus gegenüber beraubt ist, oder ob schließlich — was wohl das Wahrscheinlichste ist — beide Möglichkeiten zutreffen, Ausscheidung in den Darm und Wucherung der dort primär vorhandenen wenigen Bacillen ist nicht zu entscheiden gewesen.

Wir werden demnach den ganzen Prozeß als Sepsis auffassen müssen, dessen letztes Stadium die reichliche Wucherung im Darm ist; wo aber dieser septische Prozeß seinen Ausgangspunkt hat, darüber geben diese Fütterungsversuche keinen sicheren Aufschluß. Es war ja leicht festzustellen, daß das Einschmieren der Kultur in das Maul genügt, um das typische Krankheitsbild hervorzurufen. Aber hier konnte direkte Infektion des oralen Teiles, ferner Hineingelangen verschluckter Bacillen in die tieferen Abschnitte des Magendarmkanales, schließlich auch Aspiration in die Lungen in Frage kommen; auch das direkte Einbringen in das Rectum, das ebenfalls zum typischen Tod führt, ist zur sicheren Entscheidung nicht heranzuziehen. Dagegen wurde versucht, wie sich die Infektion bei direktem Einbringen der Bacillen (1 ccm Bouillonkultur) in den Magen mittels meiner intrastomachalen Methode verhielt. Das Eintreten einer typischen Infektion auf diesem Wege beweist natürlich ebensowenig etwas für den Primäraffekt, wie die Fütterung; wohl aber hätte das Ausbleiben einer Infektion einen Fingerzeig gegeben. Meine zahlreichen Versuche lassen sich nun dahin zusammenfassen, daß in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle eine typische Infektion auch bei direkter intrastomachaler Einführung eintrat, daß aber eine nicht ganz geringe Zahl der so infizierten Mäuse 3 Wochen und länger überlebte; diese überlebenden erlagen übrigens einer späteren gewöhnlichen Fütterung; das ist bei der großen Regelmäßigkeit, mit der die in gewöhnlicher Weise gefütterten Mäuse starben, immerhin auffällig. Auch bei größter Zurückhaltung dürfen wir deshalb das eine daraus folgern, daß auch die direkt in den Magen in sehr großer Zahl gebrachten Bacillen nicht immer zu infizieren brauchen. vielleicht sogar weniger leicht infizieren, als wenn eine gewöhnliche Fütterung erfolgt, bei der die Chancen der Infektion (durch Aspiration in die Lungen, durch Eindringen in den oberen Teil des Digestionstraktus etc.) größer sind.

Entsprechend dieser Auffassung, daß die Eintrittspforte nicht nur in einem Darmabschnitt gesucht werden kann und daß nicht die primäre Vermehrung im Darm das Ausschlaggebende des Prozesses ist, war von einer Beeinflussung der Infektion durch besondere Fütterungen nicht viel zu erwarten, und wir haben auch einige resultatlose Reihen mit besonderen Diäten zu verzeichnen.

Dagegen wurde versucht, in allgemeinen Einwirkungen auf den Organismus den Infektionsprozeß nach der Fütterung zu beeinflussen. Freilich erfordern diese Versuche große Reihen von Tieren mit ebensolchen Kontrollreihen, wenn man nicht durch das zufällig längere Ueberleben einiger Tiere, das gelegentlich bei der Abschwächung des Stammes sich einstellt, irregeführt sein will. Wir werden deshalb aus unseren zahlreichen Versuchen nur diejenigen erwähnen, die eine genügende Konstanz der Resultate bei mehrfachen Wiederholungen und bei einer großen Anzahl von Tieren ergaben. Es sind das Versuche, in denen wir die Tiere nach der Fütterung bei verschiedenen Temperaturen unter sonst möglichst gleichen Versuchsbedingungen hielten. Und zwar kamen gleichmäßige Temperaturen über 30%, ferner schwankende Zimmertemperaturen, Kellertemperaturen und gelegentlich auch Eisschranktemperaturen in Anwendung. Gewöhlich wurden je 8 oder 12 Mäuse möglichst gleicher Größe zu den Versuchen verwendet. Es hat nicht die geringste Schwierigkeit, Mäuse dauernd bei Temperaturen von +7° bis +35° zu halten, nur muß man bei feuchter Laboratoriumsluft, zumal also im Sommer, acht geben, daß nicht die Feuchtigkeit in den Mäusegläsern zu groß wird; man muß dann die Mäuse oft umsetzen. Das Resultat läßt sich dahin zusammenfassen, daß mit unserem Stamm gefütterte Mäuse bei gleichmäßiger Temperatur zwischen 30 und 35° gehalten regelmäßig um einige Tage länger leben, als die bei tieferen Temperaturen gehaltenen Mäuse. Der Verlauf ist häufig der, daß die ersten Mäuse im Brutschrank erst dann sterben, wenn bereits alle Mäuse bei tieferen Temperaturen gestorben sind, und eine Verlängerung der Zeit zwischen

Tabelle V. Füttterungsversuche bei verschiedenen Temperaturen. Serie E. 12 Mäuse, gleichmäßig gefüttert.

Todestag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
6 Mäuse im Brutschrank Temperatur: Min. +30° Max. +32° 1 2 3 4 5 6 6 Mäuse im Keller Temperatur: Min. +15,0° Max. +17,5°									†			†	++	+ .		†		Sun 77		
7 Max. +17,5°							†	++												
10 11 12								1++ .	+		WE WAR			100		Transakie		Sun 5 T		

Fütterung und Tod um 8 Tage und mehr gegenüber den anderen Mäusen ist im Brutschrank nicht selten. Aber auch wenn die ersten Mäuse gleichzeitig oder fast gleichzeitig sterben, zeigt der Durchschnitt eine Differenz zugunsten der warm gehaltenen Mäuse. Ein Beispiel zeigt Tabelle V.

Dieser Unterschied, den warm und kalt gehaltene Mäuse zeigen, ist auch deutlich gegenüber den bei warmen, allerdings schwankenden Laboratoriumstemperaturen gehaltenen Mäuse. Für dieses einzigartige Verhalten, das jedenfalls mit dem Bacillenwachstum direkt nichts zu tun hat, vermögen wir eine Erklärung auf Grund von Versuchen nicht zu geben; es ist uns aber eine Stütze unserer Anschauung, daß die allge meinen Einflüsse auf den Organismus die Resistenz gegen die hämatogene Infektion zu modifizieren vermögen. So werden auch Darmdesinfektionsmittel wirkungslos bleiben, wenn sie nicht zugleich den ganzen Körper von den eingedrungenen Keimen zu befreien helfen, und eine immunisatorisch erzielte lokale Darmimmunität würde für unseren Fall wahrscheinlich ebenfalls ohne Nutzen sein, wir haben sie auch experimentell nicht hervorrufen können.

Wir enthalten uns weitgehender Schlüsse auf andere Fütterungskrankheiten, so naheliegend die Analogie gerade mit dem Typhus erscheint. Nur möchten wir auf eine unmittelbare Konsequenz unserer Versuche hinweisen. Zu der gleichen großen Gruppe wie unser Stamm gehört bekanntlich der Mäusetyphusbacillus; es dürfte sich nach unseren Versuchen empfehlen, das Auslegen der Mäusetyphuskulturen in den für die Tiere an sich ungünstigen Jahreszeiten vorzunehmen; Feuchtigkeit und Kälte werden dem Krankheitsprozeß bei den Mäusen förderlicher sein, als gleichmäßige Wärme und Trockenheit.

Schließlich seien noch einige interessante Nebenbefunde erwähnt. Die durchschnittliche Zeit zwischen Fütterung und Tod beträgt, wie erwähnt, gewöhnlich 7-10 Tage. Ein früherer Tod (5 Tage) gehört zu den Seltenheiten, ein späterer Tod (15, 16 Tage) ist nicht so selten, aber sehr selten ist ein noch längeres Ueberleben. Ueberlebt aber einmal eine Maus die Fütterung um 3-4 Wochen, so liegt die Vermutung nahe, daß trotz aller gleichzeitigen Kontrolle vielleicht doch die Fütterungsinfektion eine unvollständige gewesen ist. Wir haben deshalb alle überlebenden Mäuse nach entsprechender Zeit nachgefüttert. Wir verfügen über wenige solcher mehrfach in langen Intervallen gefütterter Mäuse, aber wir besitzen keine einzige, welche wirklich dauernd überlebt hätte, denn schließlich, wenn auch erst nach Ablauf von Monaten, sind sie alle eingegangen, auch wenn sie wochenlang mit den Infektionserregern nicht mehr in Berührung gebracht waren; und alle derart eingegangenen Mäuse zeigten im Herzblut und Dünndarm große Mengen des Bacillus N, mit dem sie gefüttert waren. Dabei waren sie in der ganzen Zeit nie krank gewesen, sie schienen die Infektion glatt

überstanden zu haben; aber es war eben doch im Körper ein Herd zurückgeblieben — der auch einmal als Leberabszeß leicht erkennbar war — welcher plötzlich wieder aufflackerte und zum septischen Tode führte. Auf diese Weise haben wir Inkubationen von Monaten beobachtet, d. h. wir haben Fälle gesehen, wo zwischen letzter Fütterung und erster erkennbarer Erkrankung Monate lagen. Es wird keine unberechtigte Analogie sein, wenn man bei manchen menschlichen infektiösen Erkrankungen ähnliche, ungewohnt lange Inkubationszeiten supponiert.

In der Tat hat ja auch CONRADI (Klinisches Jahrbuch, Bd. 17, 1907, p. 301) solche ungewöhnlich langen Inkubationszeiten beim menschlichen Typhus beschrieben.

Zur Technik der Widalschen Reaktion.

Von

Dr. L. H. Marks (aus New-Orleans), früherem Assistenten der Abteilung.

Hierzu 2 Abbildungen.

Die von M. Neisser vor 6 Jahren ausgebildete und von F. Proescher (Centralbl. f. Bakt., Bd. 31, 1902, p. 400) publizierte Technik der Widalschen Reaktion basiert bekanntlich auf folgenden Prinzipien:

1) Verwendung einer mit Formalin abgetöteter Bouillonkultur;

2) Ansetzen einer geometrischen Reihe (Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:8 etc.) in besonders einfacher Weise;

3) alle Proben enthalten gleiche Mengen Bacillen und gleiches Gesamtvolumen;

4) Besichtigung der in flache Schälchen ausgegossenen Proben mit schwachem Trockensystem.

An einem sehr großen Material von Untersuchungen und Versuchsreihen ist die Brauchbarkeit und Bequemlichkeit dieser Technik erprobt worden, und nur kleinere Veränderungen sind im Laufe der Jahre hinzugekommen. Einmal werden seit etwa Jahresfrist die Proben nicht mehr bei 37° zwei Stunden, sondern bei etwa 45-50° eine Stunde, und dann eine Stunde bei Zimmertemperatur gehalten — ohne daß wir dies für alle Fälle besonders empfehlen möchten. Weiterhin aber schien es mir praktisch, die einzelnen Blockschälchen, die, aufeinandergestellt, gelegentlich einmal umfallen, in einem festen Glasklotz zu vereinigen; weiter war es dann möglich, die einzelnen Löcher des Glasklotzes so zu vertiefen, daß die Verdünnungen nun nicht mehr in besonderen Reagenzgläsern, sondern direkt in dem Glasklotz hergestellt werden konnten. Auf diese Weise entstand der von der Firma F. u. M. LAUTENSCHLÄGER (Frankfurt a. M.) hergestellte Glasklotz, den die Abbildung 1 in etwa halber Verkleinerung zeigt. Eingeätzte Zahlen zeigen die Verdünnungen bezw. die Kontrolle; ein besonderer Glasdeckel schützt die Probe vor Verdunstung.

Die Besichtigung kann in gewöhnlicher Weise mit dem schwachen Trockensystem des Mikroskopes erfolgen, aber es erschien der Längedes Klotzes halber zweckmäßig, ein besonderes Agglutinoskop von der genannten Firma anfertigen zu lassen. Es besteht aus vier Stützen für den Glasklotz und einem in Führung laufenden kleinen Stativ, das

48

einerseits eine Lupe (12-fach), andererseits eine Scheibe mit Planspiegel und schwarzem Revers trägt (Fig. 2).

Die Ausführung der Reaktion gestaltet sich im einzelnen folgendermaßen: Es werden stets zwei Glasklötze benutzt, der eine für die Widal-Reaktion gegenüber Typhusbacillen, der andere für die Widal-Reaktion gegenüber Paratyphusbacillen. In das erste Schälchen des



Fig. 1.

einen Klotzes kommt 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung 1), das erste Schälchen des zweiten Klotzes bleibt zunächst leer, alle anderen Schälchen erhalten 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung. In das erste Schälchen des ersten Klotzes kommt nun 0,2 ccm Serum und nach gründlicher

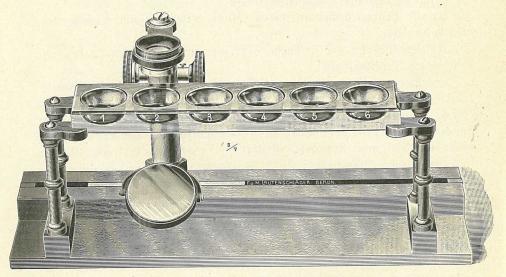


Fig. 2.

Mischung 0,8 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Es sind nunmehr 2 ccm eines 10-fach verdünnten Serums darin. Mit einer $\frac{1}{2}$ ccm-Pipette wird aus Schälchen 1 des Klotzes 1 je $\frac{1}{2}$ ccm in

Schälchen 2 des Klotzes 1

übertragen. In den zweiten Schälchen der beiden Klötze ist jetzt 1 ccm 20-fach verdünnten Serums; von da wird wieder $^{1}/_{2}$ ccm in Schälchen 3, von da nach gründlichem Durchmischen $^{1}/_{2}$ ccm in Schälchen 4, von da in Schälchen 5 übertragen; aus Schälchen 5 wird nach Durchmischen $^{1}/_{2}$ ccm entnommen und weggeblasen. Zu jedem Schälchen des Blockes 1 kommt $^{1}/_{2}$ ccm Typhuskultur, zu jedem Schälchen des Blockes 2 $^{1}/_{2}$ ccm Paratyphuskultur 1).

Es resultieren die Verdünnungen, die auf dem Klotz angegeben sind 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Das 6. Schälchen, die Kontrolle, enthält $^{1}/_{2}$ ccm Kochsalz + $^{1}/_{2}$ ccm Typhus- bezw. Paratyphuskultur. Nach zwei Stunden 37° und einer Stunde Zimmertemperatur, oder einer Stunde 50° und einer Stunde Zimmertemperatur erfolgt die Besichtigung mit dem Agglutinoskop, oder mit dem schwachen Trockensysteme des Mikroskopes. Es gehört wenig Uebung dazu, um auf dem schwarzen Untergrunde des Spiegelreverses die Haufenbildung deutlich zu erkennen. In manchen Fällen ist übrigens ein längeres Stehen bei Zimmertemperatur zweckmäßig.

¹⁾ Es ist zweckmäßig, die Kochsalzlösung durch Papier zu filtrieren.

¹⁾ Bouillonkölbehen zu 100 cem werden beimpft, nach eintägigem Wachstum mit 1 cem des käuflichen Formalins versetzt, in Maßeylinder gefüllt und 48 Stunden abermals in den Brutschrank gestellt. Darauf Abgießen von event. Sediment, nötigenfalls Filtrieren durch Faltenfilter, Konservieren im Eisschrank; etwa 1 Monat haltbar. Auch das Fickersche Reagenz (E. Merck, Darmstadt) kann benutzt werden.

Ein Abstich- und Zählapparat für Bakterienkolonien.

Von

M. Neisser.
Hierzu 4 Abbildungen.

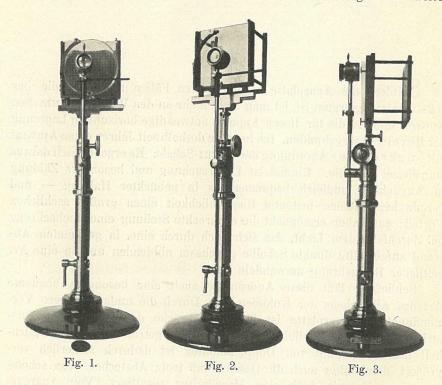
Seitdem die Agarplatte in sehr vielen Fällen an die Stelle der Gelatineplatte getreten ist, ist man nicht mehr an den Wolffhügelschen Apparat und an die für diesen Apparat notwendige horizontale Lagerung der Petri-Schale gebunden. Ich benutze deshalb seit Jahren einen Apparat mit senkrechter Anordnung der Petri-Schale. Es ergeben sich daraus mancherlei Vorteile. Einmal ist Untersuchung und besonders Zählung in Augenhöhe ungleich bequemer als in gebückter Haltung — und gerade beim Zählen bedeutet Bequemlichkeit einen großen sachlichen Vorteil; dann aber ermöglicht die senkrechte Stellung eine Beobachtung bei durchfallendem Licht, das sich auch durch eine, in geeignetem Abstand aufgestellte dunkle Scheibe gleichsam abblenden und in eine Art seitlicher Beleuchtung umwandeln läßt.

Schließlich läßt diese Anordnung auch eine besonders bequeme Art des Abstechens der Kolonien zu. Durch die umfangreichere Verwendung der Agarplatte ist für viele Zwecke das Oberflächen- Ausstrichverfahren an Stelle des Plattengusses getreten 1). Die Möglichkeit der Entstehung von Doppelkolonien ist dadurch sicherlich vergrößert, damit aber auch die Gefahr, daß trotz Abstechens von scheinbar einer Kolonie doch eine Mischkultur resultiert. Von Agarausstrichplatten wird deshalb in meinem Laboratorium nur unter Kontrolle einer Lupe abgestochen, und das ist mit dem Apparat sehr bequem zu erreichen.

Dieser Apparat, den die Firma E. Leitz-Wetzlar nach meinen Angaben angefertigt, hat und den wir übrigens schon 1907 auf der Aus-

¹⁾ Ich verwende seit Jahren an Stelle des Pinsels oder des Glasspatels etc. mit Vorteil kurze Reagenzgläser, die, in größeren, starkwandigen Reagenzgläsern steckend, mit diesen im Trockenschranke sterilisiert werden. Die runde Kuppe des inneren Reagenzglases eignet sich vorzüglich zum Ausstreichen.

stellung des Berliner Hygienekongresses ausgestellt hatten, trägt die Petri-Schale in einem senkrecht stehenden Rahmen, in den die Schale leicht einzufügen ist. Unmittelbar hinter der Petri-Schale ist eine, in Quadrate eingeteilte Glasscheibe angebracht, welche der Petri-Schale als Stütze dient und durch ihre Einteilung eine bessere Orientierung ermöglicht. Die Quadrate haben ½ cm Seitenlänge. Recht zweckmäßig ist noch die Einätzung von Zahlen in einer senkrechten und einer wagerechten Linie, doch erhöht sich dadurch der Preis der Glasscheibe. Im Abstande von etwa 6 cm ist hinter dem Schalenträger ein zweiter



Rahmen angebracht, der das Einschieben einer geschwärzten Blechscheibe ermöglicht. Der ganze bisher beschriebene Teil ist nach Art der Kreuztische in 2 Dimensionen durch bequeme Schrauben zu verschieben; dadurch kann jeder Teil der Petri-Schale vor die Beobachtungslupe eingestellt werden. Die Lupe ist fest am Stativ angebracht, läßt sich aber durch Lockern einer Schraube für die individuelle Augenhöhe einstellen. Sie befindet sich etwa 48 cm über Tischhöhe. Als Vergrößerung empfiehlt sich am meisten eine achtfache; der Abstand von der Platte ist dann etwa $2^{1/2}$ cm; durch einfaches Drehen ist scharfes Einstellen ermöglicht. Der Lupenhalter trägt an einer verschiebbaren Hülse einen wagerechten

Stab, der als Handauflage beim Abstechen dient. Das Abstechen erfolgt, zumal bei dichter Platte, ungleich sicherer, wenn der kleine Finger der abstechenden Hand einen Stützpunkt hat. Ein schwerer Fuß und eine starke Stützsäule sichern die Stabilität des Apparates. Ursprünglich war, wie die Abbildung zeigt, auch ein Umlegen und dadurch eventuell Beobachtung bei horizontaler Lage vorgesehen. Aus Gründen der Verbilligung kann von dieser nur für Gelatineplatten nötigen Komplikation Abstand genommen worden (Fig. 1, 2 u. 3). Da die Kolonien auf der Petri-Schale einigen Abstand von der quadrierten Glasplatte haben, so erscheinen bei etwas veränderter Kopfhaltung auch etwas verschiedene Teile der Petri-Schale in einem Quadrat. Um für Zählzwecke diesem kleinen Uebelstande zu begegnen, kann vor die

Beobachtungslupe eine Blende mit ganz kleiner Oeffnung gesetzt werden, welche eine genügend konstante Augenhaltung erzwingt. Auf Abbildung 1 ist diese Blende am Fuße des Stativs zu sehen.

Für die Zählung kommen nur Platten, die nicht zu dicht besät sind, in Betracht; für die dichteren Platten wird immer die mikroskopische Zählung (siehe Zeitschr. f. Hyg., Bd. 20, 1895, p. 119) angewendet werden müssen. Ganz dünn besäte Platten — bis etwa 150 Keime

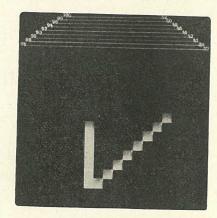


Fig. 4.

— wird man ganz auszählen, bei größeren Kolonienmengen genügt es, eine angemessene Zahl von Gesichtsfeldern mit der Lupe durchzuzählen. Das völlige Auszählen ist bei dem angegebenen Apparate durch die Kreuzführung sehr erleichtert, für das Auszählen eines Teiles der Platten habe ich dem Apparate eine besondere Zählscheibe mitgegeben, die in Fig. 4 abgebildet ist. Sie zeigt 15 quadratische Ausschnitte in einer undurchsichtigen Scheibe; die Ausschnitte, deren Fläche ½ cm ist, sind keilförmig angeordnet. Es werden, unter völliger Abblendung des übrigen Teiles der Petri-Schale, 15 Quadrate ausgezählt, darauf die Petri-Schale gedreht und wieder 15 Quadrate ausgezählt, und diese Manipulation wird im ganzen 4mal gemacht, so daß 60 Quadrate ausgezählt werden. Um jedesmal andere Teile der Platte vor die Lupe zu bekommen, markiert man sich die verschiedenen Schalenstellungen durch einen Blaustrich am Rande der Petri-Schale. Die keilförmige Anordnung der Ausschnitte ist der radiären vorgezogen, weil die radiäre

56 M. Neisser, Ein Abstich- u. Zählapparat für Bakterienkolonien.

Anordnung bei der Drehung der Platte die Plattenmitte im Verhältnis zur Peripherie zu reichlich vor die Lupe führt. Die Zählscheibe zeigt wagerechte Striche am oberen Teile, welche den Durchmesser der Petri-Schale in Millimetern angeben; am anderen Ende der Striche steht ein Index, der angibt, wieviel Mal der Flächeninhalt der 60 Quadrate in dem Flächeninhalte der ganzen Petri-Schale vorhanden ist. Man braucht also nur die in 60 Quadraten vorhandenen Kolonien auszuzählen, den der Schalengröße entsprechenden Index abzulesen und damit die gezählte Zahl zu multiplizieren, um die Zahl der Kolonien auf der Platte zu erhalten.

Ueber einen anfangs atypischen Typhusstamm.

Von

T. Ernst, früherer Assistentin der Abteilung.

Jeber einen anfaugs atypischen

Im November 1906 ging dem Institut eine Stuhlprobe zur Untersuchung auf Typhusbacillen zu; nach Angabe des behandelnden Arztes, Dr. O. Markus, dem wir für seine Auskunft auch an dieser Stelle vielmals danken, war die Dame, von der das Material stammte, im Jahre 1874 von dem Vater des Kollegen an Typhus behandelt worden; damals wurde das Hausmädchen ebenfalls sehr bald von Typhus befallen, hatte sich also vermutlich angesteckt. Seit dieser Zeit war die Dame völlig gesund, bis auf ganz gelegentlich auftretendes "Darmschneiden". Im Oktober 1906 bekam sie die erste deutliche Gallenkolik, die wieder abklang. Am 23. November 1906 neuer, milderer Anfall, und damals wurde zum ersten Male Stuhl zur Untersuchung eingeschickt. Es sei gleich hier erwähnt, daß die Patientin nun wiederum 1½ Jahre völlig Ruhe hatte, bis nach einer starken Aufregung im März 1908 Erbrechen von Galle eintrat, das 24 Stunden anhielt. Auch jetzt wieder trat rasche Rekonvaleszenz ein.

Die Aussaat der Stuhlprobe im November 1906 auf Endo-Agar ergab viele kleinere, durchscheinende Kolonien, vom Aussehen von Kolonien der Typhusbacillen. Aber sie enthielten unbewegliche Bacillen, die auch durch hochwertiges Immunserum im hängenden Tropfen nicht agglutiniert wurden. Die daraus gezüchteten Reinkulturen wurden noch einmal zu Platten verarbeitet, welche nur eine Sorte Kolonien zeigten; von einer isolierten Kolonie wurde die definitive Reinkultur angelegt. Es waren völlig unbewegliche Stäbchen, welche gramnegativ waren und im Kulturverfahren alle Eigenschaften der typischen Typhusbacillen zeigten. (Keine Vergärung von Milch- oder Traubenzucker, kein Indol, keine Verflüssigung von Gelatine oder Serum, keine Milchgerinnung, Rötung der Lackmusmolke, aërobes und anaërobes Wachstum in hohen Schichten mit Trübung des Zuckeragars.)

Diese unbeweglichen Stäbchen waren weder in lebendem noch in totem Zustande zu agglutinieren; in quantitativen Versuchen, nach der hier im Laboratorium üblichen Neisser-Pröscherschen, oder nach der Kolleschen Methode angesetzt, war in keiner Verdünnung eine Agglutination nachweisbar. Als wir aber Kaninchen mit diesem nichtbeweglichen, nicht-agglutinablen Stamm immunisierten, erhielten wir ein

hochwirksames Agglutinin, das nicht nur diesen Stamm, sondern auch die Testtyphusstämme des Laboratoriums gleich hoch agglutinierte. Ehe noch dieser Beweis geliefert war, hatte der Stamm, der täglich von Agar auf Agar und von Bouillon auf Bouillon übertragen wurde, unter unseren Augen eine seltsame Veränderung durchgemacht. Von der 7. Kulturpassage an nämlich zeigte er die lebhafte Beweglichkeit der normalen Typhusbacillen und war auch nunmehr ebenso agglutinabel wie die Teststämme des Laboratoriums; er wurde nun durch dasselbe Serum, das anfangs ihm gegenüber unwirksam war, bis zur Titregrenze agglutiniert. Er verhielt sich wie ein ganz typischer Typhusbacillus.

1½ Jahre später erhielten wir von derselben Patientin zweimal Erbrochenes, das stark gallehaltig war, ferner Stuhl und Urin. Aus allen diesen Materialien gingen wieder typhusähnliche Kolonien auf, die wieder unbewegliche, nicht-agglutinable Bacillen enthielten. Wiederum wurden durch doppelte Reinkultivierung Kolonien erhalten, die kulturell vollständig Typhusbacillen glichen; aber wiederum waren die Bacillen der ersten 7 oder 8 Generationen völlig unbeweglich und nicht agglutinabel. Wiederum wurde unter unseren Augen der Stamm — wie unabhängig von mir auch von anderer Seite beobachtet wurde — beweglich und schließlich so lebhaft beweglich, wie ein typischer Typhusbacillus. Hand in Hand damit nahm seine Agglutinabilität zu, die allmählich ebenfalls eine völlig normale wurde. Ein mit den ersten unbeweglichen, inagglutinablen Generationen immunisiertes Kaninchen ergab ein Serum, das den typischen Laboratoriumstamm normal agglutinierte.

Kurzum, in den Untersuchungsobjekten des Jahres 1906 und 1908 fand sich jedesmal ein Typhusbacillus, der durch seine völlige Unbeweglichkeit und seine komplette Inagglutinabilität leicht verkannt worden wäre. Erst die weiteren Kulturpassagen gaben dem unter besonderen Umständen augenscheinlich seit Jahrzehnten vegetierenden Stamme seine normalen Eigenschaften zurück. Daß die Inagglutinierbarkeit des Stammes übrigens nur eine scheinbare war, konnte Moreschi zeigen. Wie er mitgeteilt hat (Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. 46, 1908, p. 459), gelang es ihm mittels des Prinzips der Kettenbindung, eine Agglutination des Stammes hervorzurufen. Ich erwähne noch, daß ¼ Oese der Agarkultur für Meerschweinchen tödlich war. Von Interesse war die leichte Auflösung der Bacillen durch aktives Immunserum, auch wenn durch Formol abgetötete Bacillen verwendet wurden; ebenso leicht geschah die Auflösung der mit Formol abgetöteten Bacillen im Pfeifferschen Versuch.

Seit jenem erwähnten Dienstmädchen scheint übrigens, wie uns Herr Kollege Markus mitteilte, die Trägerin in den langen Jahren niemand angesteckt zu haben.

Kasuistische Beiträge zum Vorkommen von Bacillen der Paratyphus (Hog-Cholera)-Gruppe¹).

Von

Dr. Eckersdorff, früherem Assistenten der Abteilung.

¹⁾ Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde Ende 1906 abgeschlossen.

Nachdem Schottmüller die Aufmerksamkeit auf den Paratyphusbacillus B gelenkt hatte, verging eine ziemlich lange Zeit, ehe darauf hingewiesen wurde, daß Bakterien mit den gleichen morphologischen und kulturellen Merkmalen seit Jahren bekannt und als Erreger enteritischer Tierkrankheiten beschrieben waren. Der älteste Vertreter dieser Gruppe ist der von Salmon und Theobald Smith beschriebene Hog-Cholerabacillus, nächstdem kommen in Betracht der Mäusetyphusbacillus von Löffler, der Bacillus enteritidis von Gärtner, der Psittakosisbacillus von Nocard, der Bacillus morbific. bovis von Basenau etc. In mehreren aus dieser Abteilung hervorgegangenen Arbeiten (cf. Marks, dieses Heft, p. 37) ist in Uebereinstimmung mit früheren Autoren und in Ergänzung ihrer Befunde auf diese Verhältnisse hingewiesen worden. Es unterliegt somit heute keinem Zweifel, daß die Gruppe der Paratyphusbacillen eine umfangreiche ist, so wie etwa die Pasteurellagruppe; es ist denn auch in neuester Zeit von französischer Seite vorgeschlagen worden, in Analogie zur Pasteurellagruppe diese Bakterien als Salmonellagruppe zu bezeichnen. Freilich finden wir gewisse kleine kulturelle Unterschiede (speziell schnelleres oder langsameres Umschlagen der anfangs geröteten Lackmusmolke), aber in den wesentlichen und konstanten morphologischen und kulturellen Merkmalen herrscht — soweit wir bisher wissen — so völlige Uebereinstimmung, daß zwar die Erkennung eines Stamms dieser Gruppe für den Bakteriologen eine leichte Aufgabe ist, daß es aber im Einzelfalle bisher unmöglich ist, den Stamm mit Bestimmtheit einer Untergruppe zuzusprechen. Zur bequemen Charakterisierung der Gruppenzugehörigkeit empfahlen wir zuerst die Heranziehung des polyvalenten Schweinepestserums (Höchst a. M.). Es erübrigt sich fast an dieser Stelle die wohlbekannten Charakteristika dieser Gruppe noch einmal anzuführen, es sei nur bemerkt, daß zur Identifizierung eines jeden solchen Stamms stets folgende Untersuchungen dienten:

sehr beweglich

farblose Kolonien

keine Gerinnung

Tage an Bläuung.

Gasbildung, Zerreißung des Agars.

kleine Gasblasen in der anaëroben

erst Rötung, dann vom 2. bis 4.

gärung des Milchzuckers.

Zone, keine Zerreißung des Agars.

als Zeichen der Traubenzuckervergärung und der Nichtver-

negativ

kein Indol

Hängender Tropfen GRAM-Färbung Bouillon Endo-Platten Traubenzuckeragar in hoher Schicht (1 Proz.) Milchzuckeragar in hoher Schicht (1 Proz.) mit Zusatz von Traubenzucker (1/100 Proz.).

Milch Lackmusmolke

Barsiekow-Nutrose-Nährböden mit verschiedenen Zuckerzusätzen. Gelatine keine Verflüssigung, allmähliche Verzweigungen. Löffler-Serum keine Verflüssigung Agar dünner Belag ohne Farbstoff bildung.

Ueber die Immunitätsreaktionen ist zu sagen, daß sich mit ihrer Hilfe die eine Gruppe sicher abtrennen läßt, der Typus Moorseele der Fleischvergifter, der selten zu sein scheint. Auch sonst lassen sich manche Gruppen im allgemeinen abscheiden, so der eigentliche Paratyphus Schottmüller, aber man wird immer wieder Stämme finden. deren sichere Zuteilung zu einer Untergruppe der Paratyphusgruppe auf Grund der Immunitätsreaktionen nicht möglich ist.

Was die Versuchstiere betrifft, so ist bekannt, daß bei subkutaner und intraperitonealer Injektion von Mäusen nach wenigen Tagen der septische Tod eintritt, mit reichlichem Befunde im Herzblut und besonders im Dünndarm. Tauben zeigen ein verschiedenes Verhalten: die meisten aus Tieren gezüchteten Stämme töten Tauben bei intermuskulärer Injektion, aber alle Stämme, auch die scheinbar avirulenten, wachsen im Taubenmuskel und bringen ihn schließlich zur Degeneration. Im folgenden seien einige seltene Befunde von Bacillen dieser Gruppe mitgeteilt.

I.

Am 30. April 1906 brachte eine Frau 2 tote Papageion zur Untersuchung. Sie gab an, daß sie schon öfter Papageien gezüchtet und diese beim Kauf vor 5 Tagen von einem Händler für ganz gesund gehalten habe; sie seien aber am 26. April abends und am 27. mittags plötzlich unter Appetitlosigkeit und zunehmender Schwäche erkrankt und der erste am 27. abends, der zweite am 29. gestorben; den Händler habe sie nicht mehr auffinden können.

Es war ein grauer und ein bunter Vogel, deren Sektion keine erheblichen Veränderungen der Organe bot, außer den Fäulniserscheinungen

bei dem grauen, schon 3 Tage toten Tier. Wir strichen das Herzblut beider auf Endo-Platten aus und fanden bei dem einen Papagei nichts bakteriologisch Verwertbares. Aus dem Herzblut des anderen aber wuchsen neben einer ganzen Anzahl roter Colikolonien, deren Vorhandensein im Blut durch die beginnende Fäulnis erklärt ist, reichlich weiße runde Kolonien, von der Beschaffenheit der zur Salmonellagruppe gehörigen. Sie wurden reingezüchtet und auf die verschiedenen morphologischen und kulturellen Eigenschaften geprüft. Das Resultat stimmte mit dem Ausfall der Tierversuche und Agglutinationen überein und ergab die sichere Zugehörigkeit der Stäbchen zur Paratyphus (Hog-Cholera)-Gruppe.

Von den Tierversuchen ist nur die hohe Vogelpathogenität bemerkenswert, aber wir haben keine direkten Versuche mit Papageien gemacht. Aus diesem Grunde und aus dem weiteren, daß wir nichts darüber in Erfahrung bringen konnten, ob in der Zucht des Händlers noch weitere ähnliche Erkrankungen der Papageien vorgekommen sind, oder ob Erkrankungen der Papageienbesitzer eingetreten sind - aus allen diesen Gründen stehen wir an, unseren im toten Papagei gefundenen Bacillus als Psittakosisbacillus entsprechend dem Nocardschen zu bezeichnen. Freilich verhielt er sich völlig analog dem von KRAL bezogenen Stamm der Nocardschen Psittakosis und wurde auch durch ein mit diesem Stamme hergestelltes Serum sehr stark und fast bis zur Titregrenze agglutiniert, aber all das zeigen auch andere Stämme der Paratyphusgruppe, die mit einer Papageienerkrankung nichts zu tun haben. Bemerkenswert ist, daß ein mit dem Schottmüller-Stamm hergestelltes Serum unseren Stamm auch in 100-facher Verdünnung gar nicht beeinflußte.

II.

An 2. Stelle sei des klinischen Interesses wegen der Fall einer 27-jährigen Patientin angeführt, die mit den ausgesprochenen Zeichen einer Gallensteinkolik am 18. März 1906 in das städtische Krankenhaus in Frankfurt aufgenommen wurde. Sie war 10 Tage vorher plötzlich mit heftigem Stechen in der Lebergegend, das kolikartig etwa alle halbe Stunden wiederkehrte und einige Minuten dauerte, mit häufigem Erbrechen, Appetitlosigkeit und Fieber erkrankt; Stuhlverhaltung bestand schon 4 Tage früher; am 8. Krankheitstage bemerkte sie, daß sie am ganzen Körper gelb wurde. Die Diagnose des behandelnden Arztes auf Gallensteinkolik schien durch die genaue Untersuchung der wohlgenährten Frau im Krankenhaus zunächst bestätigt zu werden: Gallenfarbstoff im Urin, gelbe bis weiße Stühle, deutliche druckempfindliche Resistenz von der Größe eines kleinen Apfels in der rechten Parasternallinie nach unten vom rechten Leberlappen. Milz nicht tastbar, Puls zwischen 80 und 100 in der Minute, Temperatur 38,5-39 C; doch war die Zahl der weißen Blutkörperchen mit 11 400 gegen 4 800 000 der Ehrlich, Arbeiten IV.

roten erhöht. Es wurden damals systematisch bei uns alle Fälle von Ikterus auf ihr Verhalten zur Widalschen Reaktion wegen des Zusammenhanges zwischen Gallenblasenerkrankungen und abgelaufenen Typhuserkrankungen untersucht; und in diesem Falle zeigte sich in der Tat eine Agglutination des Schottmüller-Stammes durch das Serum der Patientin noch sehr deutlich in einer Verdünnung von 1:320. Wir baten daraufhin um Einsendung von Stuhl und konnten nun mittels Endo-Platten in dieser Probe und in 4 weiteren an verschiedenen Tagen entnommenen Stuhlproben massenhaft Paratyphusbacillen, 2mal geradezu in Reinkultur, nachweisen: am 13., am 19., am 25., am 27. und am 30. Krankheitstage. Dagegen gelang es nicht, die Bacillen im Urin am 28. und im Blut am 30. Krankheitstage (mittels der CONRADI - KAISERSchen Gallenröhrchenmethode) zu finden. Erst die bakteriologische Untersuchung ließ also das ätiologische Moment der Lebererkrankung erkennen.

Ich betone noch, daß anamnestisch nicht der geringste Anhaltspunkt für eine frühere Erkrankung paratyphöser Natur bestand. Der weitere Krankheitsverlauf bot wenig Charakteristisches. Ende der 2. Woche schwanden das Fieber, die erhöhte Pulsfrequenz, der Gallenfarbstoff aus Urin und Haut; Anfang der 4. Woche nahm auch die Empfindlichkeit der Unterbauchgegend und die Vermehrung der weißen Blutkörperchen ab, die schon am 20. Tage wieder auf 760: 4500 000 zurückgegangen waren. Auch in medizinalamtlicher Beziehung bietet der Fall Interesse, da auf diese Weise eine Paratyphusträgerin ermittelt wurde.

Leider war es nicht möglich, von der Patientin Blut zur WIDALschen Reaktion zu bekommen. Der herausgezüchtete Stamm war völlig typisch; er wurde durch unser mit dem Schottmüller-Stamm hergestelltes Serum stark (1:2000) agglutiniert, ein mit unserem Stamm hergestelltes Serum agglutinierte noch in der Verdünnung 1:6400 den Stamm SCHOTTMÜLLER.

III.

Als dritten Beitrag möchte ich die Entstehung und den Verlauf einer Meerschweinchenseuche anführen, die nach den anatomischen Erscheinungen als Pseudotuberkulose aufzufassen war; wir möchten daran erinnern, daß auf den nahen Zusammenhang zwischen der Hog-Choleragruppe und der Pseudotuberkulose der Nagetiere schon früher hingewiesen worden ist, unter anderem auch von Böhme in seiner Veröffentlichung aus unserer Abteilung (cf. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf.-Kr., Bd. 52). Die Aehnlichkeit mit Tuberkulose ist makroskopisch: in der vergrößerten, dunkelroten, meist weichen Milz vorzugsweise, häufig auch in der dann gleichfalls großen und blutreichen Leber und in den mesenterialen Drüsen zeigen sich vereinzelt oder über das Organ ausgesät mehr oder

weniger scharf begrenzte, über das Niveau deutlich hervorragende, gelbe bis gelbweiße Herde von weicher bis trocken-käsiger Beschaffenheit, die in der Größe zwischen einem Stecknadelknopf und einer großen Erbse schwanken. Besonders die größeren lassen sehr häufig in ihrer Peripherie feine Gefäße erkennen. Bisweilen sieht man Verklebungen oder in älteren Stadien Verwachsungen mit Nachbarorganen - Niere, Leber, Zwerchfell; häufiger liegen die Herde unter dem unverdickten Serosaüberzug oder sind manchmal mit leicht abwischbaren Fibrinflocken belegt. Ein Konfluieren von mehreren Herden, wie es bisweilen eine langsam verlaufende Impftuberkulose der Meerschweinchen zeigt, haben wir bei unseren Tieren nicht gesehen; ebensowenig ein Befallensein der Lungen, doch ist zu berücksichtigen, daß alle unsere Tiere nicht lange an der Seuche krank gewesen sind.

Zum Teil erschien auch der Darm betroffen: häufiger in Form eines Katarrhs mit diffuser Schwellung der Schleimhaut, bisweilen aber auch mit ausgesprochener Lokalisation an den Drüsenapparaten, den solitären wie den aggregierten Follikeln; sie traten dann als weiche geschwellte Herde über die Umgebung deutlich hervor, oft schon von außen sichtbar, oder zeigten in einzelnen Fällen — drei wurden konserviert — deutliche Geschwürsbildung mit aufgeworfenem, verdicktem Rand. Auch an größeren und kleineren Blutungen in die Mucosa fehlte es nicht, so daß das ganze Bild unwillkürlich an den Typhus beim Menschen erinnerte. In fast allen Fällen waren die Mesenterialdrüsen an Milz, Leber und Mesenterium geschwellt, manchmal bis Kirschkerngröße, weich; und von ihrer Schnittfläche wie von der der geschwellten Darmfollikel gelang es jedesmal, die typischen Bacillen durch Abstreifen herauszuzüchten. Auch im Pankreas saßen öfter kleinere und größere Knoten.

Im ganzen ist die Aehnlichkeit mit einer durch intraperitoneale Injektion hervorgerufenen echten Tuberkulose nicht zu bestreiten, wenn auch für den, der viele Fälle von Impftuberkulose beim Meerschweinchen gesehen hat, Verschiedenheiten nach Anordnung, Größe und dem Nebeneinander der einzelnen Stadien hervortreten. Schwierigkeiten in der Unterscheidung können entstehen, wenn beide Prozesse nebeneinander vorkommen, was wir erlebt haben, oder aber, wenn das Auftreten der Seuche bei den Versuchstieren noch nicht entdeckt ist.

Den ersten Fall, den wir hervorheben, war der folgende:

Von einem Urin, dessen Originalpräparat schon Tuberkelbacillen enthielt, waren 2 Meerschweinchen subkutan und intraperitoneal gespritzt und nach 6 Wochen getötet worden (Mitte Januar 1906). In den Organen des einen Tieres wurden Knoten und in diesen mikroskopisch Tuberkelbacillen gefunden; das andere hatte vergrößerte Mesenterialdrüsen und einen etwa erbsengroßen, gelben, etwas bröckeligen Knoten in der Milz, den wir mit einigem Zweifel auch als Tuberkulose ansprachen. Tuberkelbacillen waren nicht darin; dagegen züchteten wir daraus ein bewegliches gramnegatives Stäbchen, das morphologisch, kulturell und agglutinativ zur Gruppe der Paratyphusbacillen gehörte.

Der Befund blieb zunächst unaufgeklärt. Einige Wochen später kam ein Meerschwein mit demselben Befund zur Sektion: der Fall blieb ebenso unklar. Gegen Ende März wiederholte sich der Befund an den älteren und auch den jungen, erst kürzlich von Züchtern bezogenen Tieren öfter; wieder und wieder züchteten wir das Stäbchen heraus, so daß schließlich an dem Vorhandensein einer Seuche nicht mehr gezweifelt werden konnte. Eine Massenschlachtung bestätigte die Vermutung in ausgedehntem Maße. Von je 3 Tieren zeigte etwa eins die erwähnten Zeichen und der ganze Bestand von ungefähr 100 Meerschweinchen mußte geopfert werden. Besondere Ungelegenheit vermag eine derartige Epizootie hervorzurufen, wenn Tierversuche mit einem Stamm der Paratyphusgruppe im Gange sind; man impft dann leicht den einen Stamm und züchtet den anderen heraus.

IV.

An eine Veröffentlichung aus der Züricher medizinischen Poliklinik von Dr. A. Stoll im Korrespondenzblatt für Schweizer Aerzte, Jahrgang 35, 1905, welche vollzählig auch die wenigen vorhandenen Literaturangaben enthält, erinnert der Verlauf einer Fischvergiftung, der als 4. Beitrag hier angeführt sei. Da der behandelnde Arzt Dr. Abraham bereits im Aerztlichen Verein Frankfurt a. M. (cf. D. m. Wochenschr., Vereinsberichte 1906, No. 50, p. 2055) genauere Mitteilung gemacht hat, so beschränke ich mich auf folgende Angaben:

In einer Pension hatten etwa 30 Personen am Abendbrot teilgenommen und mit wenigen Ausnahmen auch von einer Fischmayonnaise gegessen, die aus einem größeren Seehecht hergestellt war. Schon nach wenigen Stunden fühlten sich die meisten unwohl, matt, bekamen Kopfschmerzen, Erbrechen und Durchfälle. Der sofort zugezogene Arzt konstatierte, daß die gesund gebliebenen die waren, welche von dem Fischgericht nichts gegessen hatten, und sandte von dem noch übrig gebliebenen Rest des Hechtes einen Teil zur Untersuchung an den Nahrungsmittelchemiker, den anderen zur bakteriologischen an uns. Der Fisch, der von früh bis zum Abend gestanden hatte, zeigte das gewöhnliche weiße Aussehen eines gesottenen Fisches und roch nicht anders, als Seefische gewöhnlich riechen. Die Originalpräparate enthielten eine ziemlich reichliche Bakterienflora; in den mannigfaltigen Kulturen, die wir vom Originalrest und am 2. Tage auch aus dem Herzblut der infizierten und inzwischen gestorbenen Mäuse anlegten, fielen uns bald auf den Endo-Platten weißwachsende Kolonien auf, die aus gramnegativen, lebhaft beweglichen Stäbchen bestanden. Ihre Reinkulturen ergaben sämtliche typischen

Proben der Paratyphusgruppe, dazu augenblickliche Agglutination im hängenden Tropfen durch unser Kaninchenparatyphus B-Serum in 100-facher Verdünnung. Daraufhin ließen wir uns durch den behandelnden Arzt, dem auch an dieser Stelle nochmals unser Dank ausgesprochen sei, von einigen inzwischen fast wiederhergestellten Patienten Blut und Stuhl kommen. Leider erhielten wir erst Stuhlproben (8. u. 9. Tag), als fast sämtliche Patienten wieder genesen waren; dementsprechend fanden wir in keiner der (nicht zahlreichen) Stuhlproben unsere Bacillen. Dagegen wurde unser Stamm von 5 Serumproben von 6 Patienten (8. Tag) stark agglutiniert (bis 1:2500). Diese Sera agglutinierten auch andere Stämme der Paratyphusgruppe hochgradig.

Es bestand somit kein Zweifel daran, daß der Fisch die Ursache der Erkrankung gewesen war und es blieb nur noch aufzuklären, auf welche Weise die Paratyphusbacillen in den Fisch gekommen waren. Gegen die Möglichkeit, daß eine Infektion des Fisches in der Küche vorgekommen war, sprach die Auskunft des Arztes, daß das Personal gesund gewesen war und gesund blieb, und an chronische Träger wird man deshalb nicht zu denken brauchen, weil das Personal schon lange im Dienst war, ohne daß sich etwas Derartiges ereignet hätte. Waren aber die Bacillen mit dem Fisch in die Küche gekommen, so war es auffällig, daß die Bacillen durch das Kochen nicht abgetötet waren. Nun ist ja bekannt und durch ausführliche Temperaturmessungen seit langem erwiesen, wie schwer die Hitze in das Innere großer Fleischstücke eindringt (RUBNER). Gleichwobl haben wir den direkten Versuch mit unserem Stamm an einem großen Seehecht angestellt.

Wir kauften einen frischen, großen, noch uneröffneten Seehecht von 11 Pfund, richteten ihn küchenmäßig her und schnitten ihn in verschieden große Stücke. Eins von diesen, etwa 15 cm lang und je 10 cm hoch und breit, impften wir mit einer Aufschwemmung einer eintägigen Agarkultur des isolierten Bacillus in 10 ccm Kochsalzlösung durch verschiedene Einstiche mit der langen Nadel in das Muskelfleisch.

Das Stück wurde in einem festschließenden eisernen Kochtopf eine halbe Stunde gekocht. Eine halbstündige Temperatur von 100° dürfte das Höchstmaß dessen darstellen, was man einem Fisch in der Küche zumuten darf, ohne ihn der Gefahr des gänzlichen Zerfalles auszusetzen. Das Gewöhnliche dürfte die Hälfte der Zeit und etwas niedrigere Temperatur als 100°, sogenanntes Ziehenlassen des Fisches, sein, besonders für Zwecke der Majonnaisenbereitung, wie im vorliegenden Fall. Dann entnahmen wir mit der Platinöse aus einer mittleren und einer innersten, nahe der Wirbelsäule gelegenen Stelle, welche gleichfalls die weiße Farbe des gekochten Fischfleisches hatte, etwas Material und strichen es auf Endo-Platten aus. Während des Kochens maßen wir die annähernden Temperaturen an der Peripherie des Fischstückes und im

Zentrum. Die Peripherie zeigte 100°, das tiefe Innere nur 42°. Dementsprechend waren wir am nächsten Tage nicht erstaunt, die beiden Platten dicht mit den weißen typischen Kolonien bewachsen zu sehen; die Reinzüchtung und Prüfung zeigte, daß der verimpfte Stamm gewachsen war.

Ein 2. Versuch mit der Modifikation, daß ein frisch geimpftes Stück 24 Stunden auf dem Eise stehen gelassen und dann ebenso weiter behandelt wurde, ergab denselben Erfolg und erbrachte damit den Beweis, daß die küchenmäßige Behandlung zur Abtötung der vorhandenen pathogenen Keime nicht genügt hatte.

Dies Resultat stimmt mit den früheren Versuchen Rubners über die Innentemperatur größerer Fleischwürfel nach mehrstündigem Braten und auch mit den Angaben über Paratyphusbacillen von B. FISCHER überein, nach denen bei 5 Minuten langer Erhitzung auf 75 ° die meisten (Festschrift für R. Koch, Jena 1903, p. 289), aber nicht alle Individuen abgetötet wurden. Neuerdings hat ähnliche Resultate an Würsten im Anschluß an eine Wurstvergiftung in Eupen bei Aachen durch eine Proteusart Kreistierarzt Gutzeit in Heft 6-8 der Fortschritte der Veterinär-Hygiene 3, Jahrgang, veröffentlicht.

Wie nun der Fisch, der die Veranlassung der Vergiftung gewesen war, infiziert worden ist, läßt sich natürlich nur vermuten; so viel ließ sich erweisen, daß andere zu dieser Zeit aus derselben Fischhandlung bezogene Fische keine Fischvergiftung hervorgerufen hatten. Da es sich in unserem und in dem Stossschen Fall um einen Seehecht gehandelt hatte, wird man die Vermutung nicht abweisen können. daß diese Raubfische in der Nähe der Küsten oder der Mündungen großer Ströme Nahrung zu sich genommen hatten, die mit diesen Bacillen infiziert waren, ohne daß man entscheiden könnte, ob daraus für den Fisch eine Erkrankung resultierte. Für das Zustandekommen einer derartigen paratyphösen Fischvergiftung scheint außer der Fischart noch die Größe des Fisches wesentlich zu sein. Es ereignen sich deshalb solche Fischvergiftungen auffallend häufig in Pensionaten, Gesellschaften etc., kurzum da, wo große Stücke großer Fische zur Verwendung kommen; gerade dann eben dringt die Hitze so langsam ein, daß im Inneren der großen Stücke die zur Abtötung etwa vorhandener Keime nötigen Grade nicht erreicht werden. Da aber durch das Kochen doch eine große Zahl der Keime vernichtet wird, so muß zu alledem noch eine erneute Vermehrung der Keime kommen, wenn starke Vergiftungen entstehen sollen. Augenscheinlich hat das Stehen des Fisches genügt, um diese Vermehrung der Keime herbeizuführen.

Als Kuriosum möchte ich erwähnen, daß die Ueberreste des Fisches von einer Frau vom Lande als Futter für das Vieh mitgenommen wurde; sie berichtete von selbst, daß die 2 damit gefütterten Schweine krank geworden seien.

Anmerkung (Professor M. Neisser.)

Im Anschluß an diese Mitteilung möchte ich auf 2 Nahrungsmittelmassenerkrankungen hinweisen, die wir in der Folgezeit beobachten konnten. Beidemal handelte es sich um Schwestern eines Krankenhauses, welche mit Uebelkeit, Erbrechen, Durchfall etc., erkrankten. Das erste Mal ergab die Stuhl- und die Serumuntersuchung bei den etwa 50 Erkrankten den Nachweis, daß es sich um eine echte paratyphöse Nahrungsmittelinfektion handelte, deren Ausgangspunkt allerdings nicht mit Sicherheit aufgefunden wurde; es wurden auch Stühle und Sera der nicht erkrankten Schwestern untersucht — mit negativem Erfolge. Ausführlich berichtet darüber der Oberarzt der inneren Klinik des Städtischen Krankenhauses, Herr Dr. Bingel in der Münchener medizinischen Wochenschrift.

Wenige Monate später erkrankten wieder gegen 30 Schwestern unter ähnlichen, wenn auch leichteren Erscheinungen; alle Untersuchungen von Stühlen oder Serum waren aber negativ. Auch zeigte sich, daß durch die erste Vergiftung eine Immunität gegen die zweite nicht zustande gekommen war; es waren eine Reihe Schwestern beidemal erkrankt; von Bedeutung war ferner die Tatsache, daß die letzterwähnte Vergiftung sich an einem Montag zutrug. Dadurch aber wurde ich an ähnliche leichte Massenerkrankungen erinnert, die ich in Krankenanstalten schon einige Male beobachtet hatte. Es hängt das mit dem Wirtschaftsbetrieb zusammen, der es bedingt, daß einmal die Kessel am Samstag mit Säuren gereinigt werden, und daß ferner nicht selten Speisen am Samstag angesetzt und bis Sonntag abend im Kessel belassen werden. Ohne hier auf die besonderen Ursachen dieser Art von nicht paratyphösen Massenerkrankungen einzugehen, erwähne ich sie, weil ich aus den erwähnten völlig negativen Untersuchungsresultaten im Zusammenhang mit den epidemiologischen Nachforschungen zu dem Urteil kam, daß die zweite unter scheinbar gleichen Umständen und gleichen Erscheinungen, wie die erste auftretende Massenerkrankung in ihrem Wesen von der ersten völlig verschieden war. Die eigentliche Ursache der ersten Massenerkrankung war außerhalb des Krankenhauses, die der zweiten im Wirtschaftsbetrieb zu suchen.

Weiteres zur Schardingerschen Reduktionsprobe.

Von

Dr. Siegfried Oppenheimer (aus Frankfurt a. M.).

Weiteres zur Schardingerschen Reduktionsprobe.

On Stegisted Opponheimer

In 2 aus der Abteilung hervorgegangenen Arbeiten (SMIDT, Hyg. Rundschau, 1904, p. 1137, und Brand, Münch. med. Wochenschr., 1907) ist über die Schardingersche Reaktion berichtet worden. Die Reaktion besteht bekanntlich darin, daß zu Milch eine Mischung von Methylenblau und Formalin zugesetzt wird. Die frische ungekochte Milch reduziert bei 45-50° das Methylenblau-Formalingemisch (FM) in kurzer Zeit. In der Arbeit von Smidt waren die verschieden reduzierenden Faktoren der Milch kritisch besprochen worden, und es war festgestellt worden, daß es ein originäres Ferment der Kuhmilch, nichtbakterieller Natur, gäbe, an dessen Vorhandensein die Reaktion geknüpft sei. Brand hatte als Optimum der Reaktion die Temperatur von 70° ermittelt und glaubte damit ein Mittel gefunden zu haben, um dieses originäre Ferment wirken zu lassen, ohne daß der störende Einfluß der Bakterien — die eben durch diese Temperatur gelähmt würden — hervorträte. Er glaubte die 70°-Reaktion empfehlen zu können, nicht nur um gekochte von roher Milch, sondern auch um alte, also bakteriell zersetzte, von frischer, verdünnte von reiner Milch zu unterscheiden. Gegen diese Arbeiten ist Seligmann mehrfach (zuletzt Zeitschr. f. Hyg., Bd. 58, 1907, p. 1) aufgetreten.

Ich habe die durch Brands vorzeitigen Tod ins Stocken geratenen Nachprüfungen wieder aufgenommen und mich davon überzeugt, daß auch die 70°-Reaktion nicht nur in der frischen unzersetzten Milch vorkommt. Ich habe in einer Reihe von Fällen auch in Milch, die 24 Stunden bei 22° gestanden hatte, eine prompte FM-Reaktion bei 70° erhalten und gebe Seligmann auch darin Recht, daß die Geschwindigkeit der FM-Reaktion (70°) in Milch, die einige Stunden bei 37° gehalten wird, sogar zunehmen kann. In der heutigen Form ist deshalb die FM-70°-Reaktion noch nicht geeignet, um unzweideutig über den Zersetzungsgrad einer Milch Aufschluß zu geben. Hingegen habe ich niemals in gekochter und wieder beimpfter Milch eine typische FM-70°-Reaktion auftreten sehen.

Wenn wir Seligmann hierin zustimmen, so können wir ihm in einem uns noch wesentlicher erscheinenden Punkte nicht beitreten. Seine Auffassung über die Reduktionserscheinungen in der Milch zeigt sich am prägnantesten im Schlußabsatze seiner erwähnten Arbeit. Er schreibt auf p. 13:

"Die mitgeteilten Versuche haben demnach ergeben, daß auch die 70°-Reduktion in Milch eine Reaktion bakteriellen Charakters ist, daß infolgedessen unsere Anschauung von dem bakteriellen Charakter der Reduktasen unerschüttert geblieben ist.

Damit will ich nicht behaupten, daß das Vorhandensein von echten reduzierenden Fermenten in der Milch ausgeschlossen ist; nur, was bisher als Fermentwirkung angegeben wurde, hat sich nicht als solche erwiesen. Die bisher bekannten Reduktionsvorgänge in frischer wie in älterer Milch sind nach dem Ergebnisse unserer Untersuchungen bakterieller Natur."

Ohne auf die vielen indirekten Beweise für oder wider diese Anschauung hier näher einzugehen, begnüge ich mich mit dem direkten Beweise, den schon Brand geführt hat, und den ich in ausgedehnterem Maßstabe wiederholt habe. Wenn die Reaktion mit frischer, steriler oder fast steriler Milch unmittelbar nach dem Melken gelingt, so ist dies ein unumstößlicher Beweis dafür, daß die Bakterien der Milch nicht die Ursachen der FM-Reduktion in frischer Milch sind; ehe nicht diese Tatsache widerlegt ist, muß an dem Vorhandensein eines originären Reduktionsstoffes, der unabhängig von bakterieller Wucherung ist und in die frische Milch aus der Kuh übergeht, festgehalten werden. In einem Kurmilchstalle, in dem außerordentlich sauber gemolken wird, bot sich mir durch das Entgegenkommen des Besitzers, Herrn Gottschalk, Gelegenheit zu diesen Untersuchungen. Ich ging folgendermaßen vor:

Das Kuheuter wurde stets vor dem Melken gründlich gewaschen. Die zur Untersuchung benutzte Milch wurde immer in der Mitte des Melkens entnommen, mit Ausnahme einiger besonders gekennzeichneter Fälle. Von der sofort in Eis gekühlten Milch wurde 1 ccm für jede Agarplatte verwandt, der Rand der Petrischen Doppelschale wurde mit Heftpflaster verklebt, um beim Transporte der fertigen Platten ins Laboratorium nachträgliche Verunreinigung auszuschließen, und die Schalen im Brutschranke bei 37° aufgehoben. Die Keimzählung wurde nach 3 Tagen bei Durchleuchtung mit einer kleinen elektrischen Bogenlampe vorgenommen (Lupe). Bei den ersten 10 Kühen wurde nur die 50°-Reaktion, bei den folgenden 6 auch die 70°-Reaktion angestellt. Sowohl der Plattenguß als die Anstellung der Reaktionen fanden in einem Raume neben dem Kuhstalle statt.

Die folgende Tabelle zeigt die Resultate:

Kuh No.	Datum des Melkens	in M	FM 70°	Keimzah in 1 ccm	l Bemerkungen
21 17 32 14 23 35 33 27 9 26 25 22 24 31	24. IV. 08 29. IV. 08 29. IV. 08 29. IV. 08 29. IV. 08	$\begin{array}{c} 4^{8}/_{4} \\ 6^{3}/_{4} \\ 6^{3}/_{4} \\ 7^{1}/_{4} \\ 6 \\ 5 \\ 9^{1}/_{4} \\ 3^{3}/_{4} \\ 7^{3}/_{4} \end{array}$ $\begin{array}{c} 12 \\ 8 \\ 14^{1}/_{2} \\ 7^{1}/_{2} \\ 6^{3}/_{4} \\ 7^{1}/_{2} \end{array}$ 11	1 ¹ / ₄ 6 1 ³ / ₄ in 32 Min, nicht ganz weiß in 7 ¹ / ₄ Min, nicht ganz weiß 2 ¹ / ₂	3 537	Erste Strahlen der Milch Mittlere Strahlen der Milch Jüngere Kuh, erst 5 Wochen ge- molken Aelteste Kuh im Stalle, mehr als 1 Jahr gemolken Erst vor 2 Monaten gekalbt Erste Strahlen der Milch Mittlere Strahlen der Milch

Mit Ausnahme einer Milch, die von einer jungen Kuh, die vor 2 Monaten gekalbt hatte (No. 31), stammte, ist in sämtlichen in der Mitte des Melkens entnommenen Milchproben eine prompte FM-Reaktion eingetreten.

Es ergibt sich aus der Tabelle:

I. Sämtliche frisch ermolkenen 18 Proben, die von 16 Kühen stammten, ergaben die Schardingersche Reaktion bei 50° innerhalb 15 Minuten, davon 15 innerhalb 10 Minuten.

II. Ordnet man die Proben nach der Geschwindigkeit der Reaktion (wobei die beiden Proben: "erste Strahlen" auszuscheiden sind) und fügt man die Keimzahlen der Proben bei, so ergibt sich folgende Tabelle:

Kuh	Reaktionszeit in Minuten	Keimzah
25 35 21 23 14 10 30 17 24 32 22	$ \begin{array}{c} 3^{1/2} \\ 3^{3/4} \\ 4^{3/4} \\ 5 \\ 6 \\ 6^{1/2} \\ 6^{3/4} \\ 7^{1/4} \end{array} $	58 15 122 20 500 7 800 53 345 120 12 15 2
31} 33 9 27 26	$7^{1}/_{2}$ $7^{3}/_{4}$ 8 12 $14^{1}/_{2}$	18 150 15 500 11

Es besteht also nicht der geringste Parallelismus zwischen Keimzahl und Reaktionsgeschwindigkeit (50°).

III. Die überwiegende Mehrzahl der Proben ist als sehr keimarm, einzelne sind als fast steril zu bezeichnen.

IV. Die 70°-Reaktion trat bei Untersuchung von 6 Kühen 5mal innerhalb 7½ Minuten auf, 1mal bei einer Kuh, die erst 2 Monate vorher gekalbt hatte, auch in 32 Minuten noch nicht komplett. Auch bei der 70°-Reaktion war kein Parallelismus mit der Keimzahl nachweisbar.

V. Die ersten Strahlen, die verhältnismäßig keimreich — und bekanntlich fettarm — sind, ergaben in den zwei untersuchten Fällen erheblich langsamere Reaktion, als die mittleren Strahlen. Es ist dies wohl auf die schon von Smidt gefundene Abhängigkeit des Reduktionsstoffes vom Fett zurückzuführen.

Es muß nach alledem daran festgehalten werden, daß die SCHAR-DINGERSche Reduktionsprobe der frisch ermolkenen Milch von einem Stoffe herrührt, der mit den Milchbakterien nichts zu tun hat. Diesen originären Reduktionsstoff hat SMIDT Aldehydkatalase genannt. Die originäre Aldehydkatalase ist von den direkten oder indirekten bakteriellen Reduktasen streng zu unterscheiden.

Ueber zwei Hausapparate zur Ozonisierung von Wasser.

Von

M. Neisser.

Hierzu 4 Abbildungen.

Von den Felten & Guilleaume-Lahmeyerwerken A.-G. Frankfurt a. M. wurden mir 2 Ozonapparate zur Verfügung gestellt, bei denen die Ozonerzeugung durch den Strom der Lichtleitung erfolgt und die Mischung des Ozons mit dem Wasser mittels einer an den Wasserhahn angesetzten Saugdüse geschieht. Das durch den Wasserstrom angesaugte Ozon mischt sich besonders innig mit dem Wasser. Das Oeffnen des Wasserhahnes bewirkt zugleich die Ozonerzeugung und die Mischung des Ozons mit dem Wasser.

Der Ozonerzeuger besteht bei beiden Apparaten aus einem in einen Schutzkasten eingebauten Hochspannungstransformator 120/5000 Volt mit Plattenkondensator. Die Platten des Kondensators sind aus Glas mit Metallbelag und haben geringen Abstand voneinander. In dem Raume zwischen den Platten entstehen die violetten Ausstrahlungen, welche einen Teil des Sauerstoffes der Luft in Ozon umwandeln. Diese Ozonluft wird von der Saugdüse abgesaugt, so daß fortwährend frische Luft zwischen die Platten nachströmen muß. Hierdurch erfolgt auch die notwendige Kühlung der Kondensatorplatten. Ich bemerke hierbei, daß bei höherer Temperatur eine Umwandlung von O₂ in O₃ nicht zustande kommt. Der Ozonerzeuger wurde an das hiesige städtische Netz 120 Volt, 45 Perioden angeschlossen und verbrauchte 0,55 Ampère. Die erzeugte Ozonmenge betrug 5—6 mg per Liter Luft bei etwa 2 l Luft in der Minute.

Der Emulseur "Otto" ist nachstehend in Ansicht und im Schnitt wiedergegeben (Fig. 1). Man erkennt die aus 2 konischen Röhren gebildete Saugdüse mit angebautem Wassersack und Auslauf. Das Wasser strömt von oben ein, reißt die seitlich ankommende Ozonluft mit, mischt sich in dem unteren Hohlkonus und Wassersack und verläßt am Auslauf den Apparat. Das ausströmende Wasser riecht zunächst noch stark nach Ozon, der Geruch verschwindet jedoch nach wenigen Sekunden. Bei den Versuchen betrug der Ozonverbrauch pro Liter Wasser 2,5—3 mg.

Ehrlich, Arbeiten IV.

Es ist ja bekannt, wie wenig löslich das Ozon im Wasser ist, und daß deshalb eine außerordentlich gute mechanische Durchmischung nötig wird, wenn Keimtötung eintreten soll. Es schien von vornherein nicht gerade wahrscheinlich, daß die kurzdauernde Durchmischung in dem Wassersacke ausreichen sollte, um eine Wassersterilisierung zu bewirken, und die ersten Versuche zeigten auch kein Resultat; aber die Versuchsanordnung war technisch so unvollkommen, daß diese Versuche jede Beweiskraft verloren und durch sachgemäßere ersetzt werden mußten. Außer der Ozonmenge und der Durchmischung kommt es

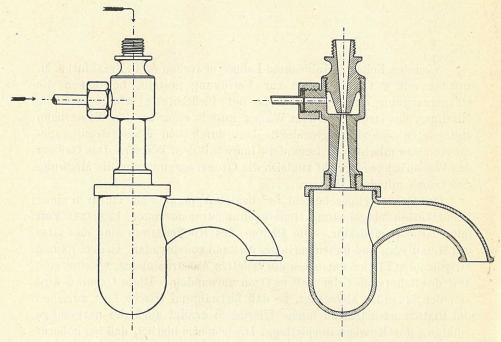


Fig. 1. Emulseur Otto (1:2).

bei der Wasserozonisierung bekanntlich wesentlich auf das Wasser selbst an, nicht sowohl hinsichtlich seines Bakteriengehaltes, als vielmehr bezüglich seiner allgemeinen Qualitäten, zumal seines Gehaltes an organischen Stoffen und suspendierten Bestandteilen etc. Die Zahl der Keime ist diesen Einflüssen gegenüber ziemlich nebensächlich; wenn ein Wasser für Ozonisierung überhaupt geeignet ist, macht es wenig aus, ob Hunderte oder Tausende von Keimen in einem Kubikzentimeter vorhanden sind. Uns stand das Leitungswasser der Stadt Frankfurt einerseits — das ein Gemisch von Quell- und Grundwasser ist und im folgenden als Trinkwasser bezeichnet werden wird —, das rohe Mainwasser andererseits zur Verfügung. Das letztere war im rohen Zustande zur Ozonisierung nicht geeignet, das Trinkwasser aber enthielt so wenige Keime,

daß eine Konstatierung der Ozonwirkung kaum möglich war. Es mußten deshalb dem Trinkwasser Bakterien künstlich zugesetzt werden; außerdem aber verlangt der "Отто"-Apparat einen Wasserdruck von etwa

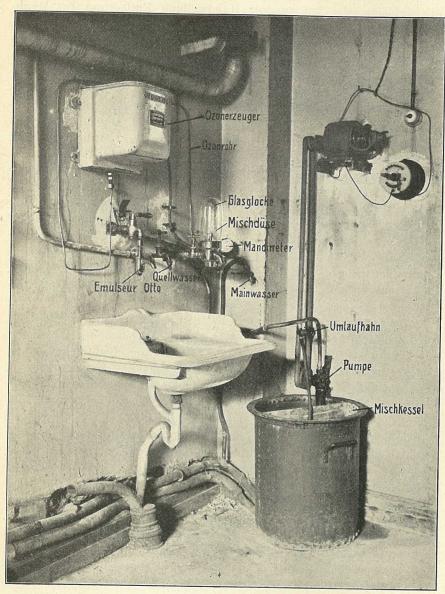


Fig. 2.

2 Atmosphären, denn nur dann wird genügend Ozon aus dem Ozonisateur angesaugt. Herr Ingenieur Fuss, der mir bei allen Versuchen beigestanden hat, löste diese Schwierigkeit auf folgende Weise: Ein Mischgefäß von 60 l Inhalt konnte nach Bedarf mit Trinkwasser oder aber mit Mainwasser gespeist werden. Eine kleine elektrisch betriebene Zahnradpumpe ermöglichte in kurzer Zeit Durchmischung innerhalb des Mischgefäßes, oder bei anderer Hahnstellung Entleerung des Mischgefäßes durch den Emulseur "Otto", und zwar ließ sich der Druck, mit dem das Wasser aus dem Mischgefäße gehoben und durch den Emulseur gepreßt wurde, von 0,4 bis auf 3 Atmosphären beliebig einstellen. Ein Manometer ließ den Druck erkennen; die Auslaufgeschwindigkeit wurde direkt gemessen.

Die Abbildung 2 zeigt den Ozonerzeuger, an dessen unterem Rande das Rohr, durch welches das Ozon angesaugt wird, abgeht. Unterhalb des Ozonisateurs ist der Hahn mit dem Emulseur "Otto" zu sehen, er ist zur Zeit der Aufnahme des Bildes nicht mit dem Ozonrohr verbunden gewesen. Rechts neben dem Emulseur "Otto" sind der Zapfhahn der Trinkwasserleitung, weiter rechts ein noch zu besprechender Hahn mit der Mischdüse "F. G. L." und einer Glasglocke, dann das Manometer und schließlich der Zapfhahn der Mainwasserleitung zu sehen. Das im Mischkessel vorbereitete Wasser wurde durch die kleine Pumpe sowohl dem Mischhahn "F. G. L." als auch dem Emulseur "Otto" durch einen nur schlecht auf dem Bilde erkennbaren Rohrstrang zugeführt. Das Ozonrohr konnte sowohl mit dem Emulseur "Otto" als mit dem Mischhahn "F. G. L." verbunden werden.

Als Zusatz zu dem Wasser wurden Staphyl. pyog. aur. und Bact. coli (aus Säuglingsstuhl stammend) gewählt. Nachdem das Mischgefäß mit Trinkwasser gefüllt war, wurden 10-30 ccm Bouillonkultur der betreffenden Bakterienart zugesetzt, mittels der Pumpe durchgemischt, dann die Schaltung geändert und nun mit 11/2 oder 2 Atmosphären Druck das bakterienhaltige Wasser durch den Emulseur oder den Mischhahn gepreßt. Das Manometer wurde abgelesen, die geförderte Wassermenge gemessen, nach einigen Minuten wurde die erste Probe entnommen und darauf die Lichtleitung zum Zwecke der Ozonerzeugung eingeschaltet. Wenige Sekunden darauf roch das ausfließende Wasser stark nach Ozon - man brauchte es nur einige Sekunden stehen zu lassen, um den Geruch zum Verschwinden zu bringen. Etwa 3 Minuten nach Einschalten des Ozons wurde die 2. Probe entnommen, darauf die Lichtleitung ausgeschaltet und nach abermals etwa 3 Minuten — nunmehr also wiederum ohne Ozon — eine letzte Probe entnommen. Bei Verwendung von Staphylokokken und Coli wurden Agarplatten gegossen, die nach 1-3-tägigem Stehen bei 37° gezählt wurden. Dieses Schema der Untersuchung wurde natürlich nach Bedarf modifiziert; andere Druckverhältnisse, verschiedene Bakterienmenge, kürzere Zeiten der Ozoneinwirkung wurden probiert etc. Das alles aber ist verhältnismäßig unwesentlich gegenüber der festgestellten und immerhin bemerkenswerten Tatsache, daß — geeignete Wasserqualität vorausgesetzt

— mittels der Ottoschen Anordnung eine Vernichtung von Tausenden von Bakterien pro Kubikzentimeter, sofern sie die Resistenz der Staphylokokken bezw. des Bact. coli haben, mit Sicherheit möglich ist. Die große Giftigkeit des Ozons für Bakterien zeigt sich eben darin, daß bei inniger Berührung mit dem Ozon nur außerordentlich kurze Zeiten zur Keimtötung nötig sind.

Das folgende Protokoll zeigt einen typischen Versuch: 60 l Trinkwasser + 10 ccm einer 1-tägigen Colibouillonkultur. Nach gründlichem Durchmischen Entnahme aus dem Emulseur "Otto".

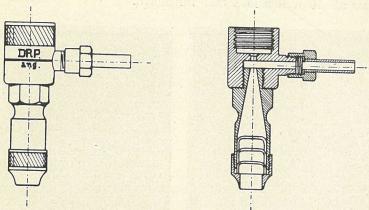


Fig. 3. Mischdüse "F. G. L." (2:3).

ohne Einschaltung des Ozons bei 1 Atmosphäre Druck (2,4 l Wasser pro Minute) danach Einschaltung des Ozons, nach einigen Minuten neue Probe dann Erhöhung des Wasserdruckes auf 2 Atmosphären (3,6 l Wasser pro Minute), danach neue Probe dann Ausschaltung der Ozonerzeugung, nach wenigen Minuten neue Probe

etwa 43 000 Keime in 1 ccm

, 5 000 , , 1 ,

2 , , 1 ,

40 000 , , 1

Aus technischen Gründen schien es angebracht, einen bei geringerem Drucke arbeitenden Mischhahn zu ersetzen. Herr Ingenieur Fuss konstruierte deshalb eine Mischdüse, bei welcher der Wasserstrahl durch besondere Führung in zahlreiche sich noch vielfach brechende Wasserfäden aufgelöst und so in innigste Berührung mit dem Ozon gebracht wurde. Die Mischdüse "F. G. L." ist hier abgebildet (Fig. 3). Um diese Berührung noch längerdauernd zu machen, wurde anfangs das Wasser noch durch eine in der Abbildung 2 sichtbare Glasglocke geführt, in der es als Springbrunnen aufschoß, um an den Wänden in dünner Schicht abzufließen. Diese Anordnung hat sich ausgezeichnet bewährt, aber es zeigte sich, daß auf die Glasglocke verzichtet werden

konnte, wenn nur die Mischdüse entsprechend verlängert wurde. Die Resultate mit dieser Mischdüse "F. G. L." sind insofern noch günstigere, als mit dem Emulseur "Otto", als mit dieser Mischdüse schon bei geringerem Leitungsdrucke genügend Ozon angesaugt, und als bei gleichem Drucke größere Wassermengen pro Minute gefördert werden. Bei dem eben erwähnten Versuche wurde neben dem Emulseur "Otto" auch die Mischdüse "F. G. L." zum Vergleiche herangezogen. Schon bei 0,6 Atmosphären Druck (2 1 Wasser pro Minute) ging die Keimzahl von 43 000 auf 5000 herunter, bei 1 Atmosphäre (2,6 1 Wasser pro Minute) waren nur noch 11, bei 2 Atmosphären (4 1 Wasser pro Minute) weniger als 10 Keime in 1 ccm vorhanden.



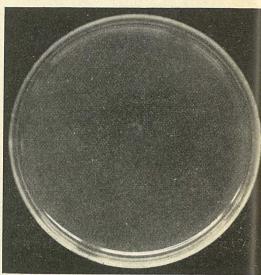


Fig. 4.

Wir haben eine Anzahl Versuche mit verschiedenen Mischdüsen nach dem System "F. G. L." angestellt mit Bact. coli und mit Staphylokokken, welche alle das gleiche Resultat ergaben: Schon bei einem Drucke von 1,5 Atmosphären wurden nach kurzer Zeit fast sämtliche zugesetzten Keime abgetötet. Freilich gingen ganz vereinzelt Keime auf, häufig nur 2 oder 4 — und diese sind wohl als zufällig am Auslaufsrande hängen gebliebene anzusehen — aber Tausende und Zehntausende der zugesetzten Keime waren trotz der so kurzen Berührung mit dem Ozon abgetötet. Die Abbildung 4 zeigt 2 Platten eines solchen Versuches. In wie kurzer Zeit die ganze Mischdüse keimfrei wird, zeigt der folgende Versuch mit einem älteren Modelle der Mischdüse "F G. L.":

601 Trinkwassser + 10 ccm einer 2-tägigen Staphylokokkenbouillon-

kultur; 1,5 Atmosphären Druck, 2 l Wasser pro Minute. Mit je $^{1}/_{2}$ ccm wurden Agarplatten gegossen, die nach 3-tägigem Stehen bei 37° gezählt wurden:

ohne Ozon					
	11 200	Keime	in	1	ccm
nach 10 Sekunden Ozon	20				
" weiteren 20 Sekunden Ozon		"	77	1	77
150		"	22	1	22
" " " 150 " " " "	4	"		1	
dann Steigerung des Druckes auf 2 Atmosphären		"	"	-	77
(2,3 1 Wasser pro Minute)					
Ctoines CO11	2	77		1	
Steigerung auf 21/2 Atmosphäre (2,5 l Wasser pro		"	11		77
Winnital	C			_	
danach ohne Ozon	16 000	77	22	1	22
1 7 OZOII	16 000	transfer .		1	
dann Einschaltung des Emulseur "Otto", 2 Atmo-		77	77	-	"
sphären Druck (3,2 1 Wasser pro Minute)	E I WE SEE				
or Didon (0,2 i wasser pro Minute)	16	"		1	100
		"	11	11	77

Die hygienische Bedeutung der wenigen überlebenden Keime wird man nicht hoch veranschlagen; wir wissen aus der Filtrationserfahrung, von welch großer Bedeutung eine erhebliche Reduktion der Keimmengen ist — in unseren Versuchen ist aber bei dem enormen künstlichen Zusatze diese Reduktion eine so außerordentliche, daß sie in praktischer Beziehung einer völligen Keimvernichtung fast gleich zu erachten ist.

Es soll nicht der Zweck dieser Zeilen sein, die praktische Verwendung dieser Hausapparate zu empfehlen; sie sind ja sicherlich nur als Notbehelf anzusehen, und ihre Verwendbarkeit wird auf besondere Fälle beschränkt sein. Immerhin aber ist es von Bedeutung, daß derartige Apparate existieren. Wichtig erscheint mir der Nachweis, daß bei inniger Mischung die momentane Berührung mit genügenden Mengen Ozon zur Keimtötung genügt. Diese Tatsache dürfte auch für die Konstruktion im Großbetriebe zu berücksichtigen sein.

Das bisher Gesagte gilt, wie anfangs betont wurde, nur für ein geeignetes Wasser, und das von uns benutzte Trinkwasser mit seinem minimalen Gehalte an organischen Stoffen, ohne suspendierte Bestandteile und ohne Eisen, stellt natürlich das Optimum der Bedingungen dar. Verwandten wir Mainwasser, natürlich ohne künstlichen Bakterienzusatz, so war auch bei Verdünnung mit Trinkwasser bis zur Hälfte weder mit dem Emulseur "Otto", noch mit der Mischdüse "F. G. L." irgend ein Effekt zu konstatieren; mischten wir 1 Teil Mainwasser mit 3 Teilen Trinkwasser, so trat mit Emulseur "Otto" oder Mischdüse "F. G. L." eine Keimreduktion um das 10—20-fache ein (3800 bis etwa 190 im Minimum). Diese Verhältnisse waren natürlich schwankend, je nach der Beschaffenheit des Mainwassers an dem betreffenden Tage. So fanden wir einmal bei Mischung von 1 Teil Mainwasser mit 6 Teilen Trinkwasser:

88 M. Neisser, Zwei Hausapparate zur Ozonisierung von Wasser.

 vorher ohne Ozon
 17000 Keime in 1 ccm

 mit Ozon
 250 , , 1 , 1 ,

 nachher ohne Ozon
 23000 , , 1 ,

Ein andermal bei Mischung von 1 Teil Mainwasser mit 4 Teilen Trinkwasser:

 vorher ohne Ozon
 11 500 Keime in 1 ccm

 mit Ozon
 45 , , 1 , 1 , n

 nachher ohne Ozon
 11 000 , 1 , 1 , n

Die Qualität des Wassers ist also ausschlaggebend; man wird sich deshalb u. a. dieser Apparate auch dazu bedienen können, um im Versuche festzustellen, ob ein Wasser, das in großem Maßstabe ozonisiert werden soll, zur Ozonisierung überhaupt geeignet ist, und man wird dann mit Vorteil die skizzierte Versuchsanordnung mit künstlichem Zusatze von Bakterien benutzen können. Für transportable Apparate, z. B. für militärische Zwecke, die für allerhand Arten von Wasser geeignet sein sollen, kann die Ozonisierung mit diesen Apparaten nur dann in Betracht kommen, wenn eine Behandlung des Wassers — z. B. Ausfällung oder Filtration — vorangegangen ist, welche eine derartigen Reinheitsgrad des Wassers bewirkt, wie er für die Keimtötung durch Ozon nötig ist.



008870140137 LANCEN 3

C 366 10.12.03



Tel.: 06462 / 5581