[Aus dem Laboratorium der II. medicinischen Klinik zu Neapel.]
(Director: Prof. A. Cardarelli.)

Immunisirungsversuche gegen Influenza.

Von

Dr. **Arnold Cantani jun.**,
Privatdocent und Präparator in der Klinik.

Bei dem so mannigfaltigen Heranwachsen der bakteriologischen Studien in diesen letzten Jahren wurde gerade der Immunisirungsfrage eine besondere Beachtung von den meisten Forschern geschenkt. Die so glänzend gelungenen Experimente über Heilserumtherapie bei Diphtheritis erweckten fast bei Allen die Hoffnung, dass man auch bei anderen Infectionen dieselben Resultate hätte erreichen können; es wurde daher ganz eifrig mit Immunisirungsversuchen bei fast allen ätiologisch bekannten und unbekannten Infectionen gearbeitet und es sammelt sich in wenigen Jahren eine ungeheure Litteratur über dieses so lockende Thema. Während sich aber die Heilserumtherapie bei Diphtheritis so glänzend bewährte, konnte man bei den anderen Infectionen lange nicht so ermutigende Resultate erlangen. Es gelang in der That mit fast allen Bakterien eine experimentelle Immunisirung bei Thieren zu erzeugen, die serotherapeutischen Versuche blieben dagegen fast immer ohne Erfolg, wenn man ihnen einen praktischen Werth zu geben versuchte.

An Stelle der in so rapider Weise hinaufgeschwungenen und ebenfalls schnell heruntergekommenen Serumtherapie ist aber in letzter Zeit eine viel constantere Erscheinung, die man auch therapeutisch zu verwerthen versucht hat, immer mehr in den Vordergrund getreten. Die Möglichkeit nämlich einer erfolgreichen Schutzimpfung hat sich bei fast allen bekannten und auch bei vielen unbekannten Infectionen als praktisch verwerthbar bewiesen. Es ist zahlreichen Forschern nicht gelungen, die

Hundswuth serotherapeutisch zu behandeln, die alte Pasteur'sche Immunisirungsmethode leistet aber noch immer unschätzbare Dienste. Die Versuche, gegen Cholera, Typhus, Pest einen Schutz mittels activer Immunisirung der diesen Krankheiten ausgesetzten Individuen zu verleihen, haben ohne Zweifel viel bessere Resultate geliefert als diejenigen, die eine passive Immunität mittels Serumtherapie erzeugen wollten.

Bei den so mannigfaltigen serotherapeutischen Versuchen, die in den letzten Jahren ausgeführt worden sind, hat die Influenza, wie natürlich, den letzten Platz; die Influenzabacillen waren nur seit kurzer Zeit entdeckt, ihre Pathogenität auf Thiere war noch nicht gut festgestellt, die Züchtung von diesen so zarten Bacillen bot Anfangs den meisten Forschern grosse Schwierigkeiten. Die erste Arbeit über Immunisirungsversuche gegen Influenza erschien gerade in jener Zeit, wo die negativen Resultate über Serumtherapie immer zahlreicher wurden; es war daher natürlich, dass diese Versuche die pessimistische Stimmung der in derselben Zeit erschienenen Arbeiten wiedergaben.

Die sorgfältige Arbeit von Delius und Kolle¹ konnte sich, nach dem eben Gesagten, diesem allgemeinen Skepticismus nicht entziehen; die Beziehungen zwischen Serumtherapie und Immunisirung waren in jener Zeit, wo diese Arbeit erschien, noch zu nahe zusammengefasst; das negative Ausbleiben der serotherapeutischen Versuche brachte mit sich als Folge auch die Möglichkeit der Immunisirung leugnen zu müssen.

Die Immunisirungsversuche selbst von diesen Autoren können wir aber nicht als sehr glänzend betrachten, denn die von ihnen mit progressiv steigenden Dosen von Influenza behandelten Thiere, die Einspritzung von höchstens 10fachen tödtlich Dosen vertrugen, gingen aber bei der weiteren Behandlung ausnahmslos zu Grunde. Um die Specificität der Influenza-immunisirung genau zu bestimmen, wurden von den letztgenannten Forschern auch einige Controlexperimente mit Meerschweinchen, die gegen Cholera immunisirt waren, angestellt; diese Thiere vertrugen, ganz ähnlich wie die gegen Influenza immunisirten Meerschweinchen, eine doppelt oder dreifach tödtliche Dosis, ein Zeichen, dass es sich bei den mit Influenza behandelten Thieren eher um Erscheinungen einer erhöhten Resistenz, als einer specifischen Immunität handeln konnte.

Die Serumexperimente, die von diesen Autoren angestellt wurden, gaben immer negative Resultate; die mit Influenzaserum behandelten Thiere zeigten keine höhere Resistenz gegen die Einverleibung von tödtlichen Dosen von Influenzabacillen, wie diejenigen, die mit normalem Serum eingespritzt wurden, was übrigens auch selbstverständlich ist; wenn

¹ Diese Zeitschrift. 1897. Bd. XXIV.

bei anderen Infectionen das Serum von hochimmunisirten Thieren oft keine schützenden Eigenschaften entfaltet, wie hätte man ein heilwirkendes Serum bei Thieren erzeugen können, die, nach den Angaben selbst von Delius und Kolle, gar nicht immunisirt waren?

In letzter Zeit ist eine ziemlich umfangreiche Arbeit von Slatineano¹ aus dem Pasteur'schen Institut erschienen. Dieser Autor, der alle die bis jetzt erworbenen Kenntnisse über die Thierpathogenität der Influenzabacillen einer neuen Prüfung unterworfen hat, stellte auch einige Immunisirungsversuche auf Meerschweinchen und Kaninchen mittels progressiv steigenden intraperitonealen Einspritzungen von lebendigen Culturen.

Die Mortalität bei seinen Thieren war eine ungeheuer grosse; bei hundert so behandelten Meerschweinchen konnte Slatineano z. B. nur neun positive Erfolge erreichen, alle anderen Thiere starben unterwegs. Bei einem der ihm am Besten gelungenen Experimente vertrugen zwei so behandelte Meerschweinchen die höchste intraperitoneale Dosis von 6 Blutagarculturen, d. h. eine 12fach tödtliche Dosis.

Den Serumuntersuchungen schenkt Verfasser eine grössere Aufmerksamkeit; er prüfte vor Allem die agglutinirende Wirkung, die in dem Immunserum in der Proportion von 1:10 — 1:80 eintrat. Das Immunserum besass, nach den Angaben von Slatineano, eine ziemlich starke baktericide Wirkung und schützte im Gegentheil mit normalem Serum gegen die minimal tödtliche Dosis, nur wenn letzteres 24 Stunden vorher eingespritzt wurde; wenn die Einspritzung von Serum und Cultur zusammengemacht wurde, blieb das Serum fast immer wirkungslos.

Die Frage über die Möglichkeit einer echten Immunisirung gegen Influenza wurde aber von mir² schon einige Jahre vor der Veröffentlichung von Slatineano in einer kurzen Mittheilung, die ich im VIII. Congress für Medizin zu Neapel zu machen Gelegenheit hatte, erörtert. Bei der Fortsetzung von meinen bakteriologischen Studien über Influenza bot sich mir nämlich öfters die Gelegenheit, auch der Immunisirungsfrage etwas näher zu treten, und ich konnte schon damals bei der Durchmusterung von meinen Protokollen einige positive Ergebnisse ansammeln, die als sehr wahrscheinlich die Möglichkeit erscheinen liessen, eine solche Immunisirung erlangen zu können. Seit damals habe ich meine Experimente in diesem Sinne immer weiter befördert, um aus einem reichlicheren Materiale meine Schlüsse ziehen zu können. Die

¹ Septicémie expérimentale par le coccobacille de Pfeiffer. *Essais d'immunisation*. 1901. Paris Laval.

² Verhandlungen des VIII. Congresses für Medizin zu Neapel. — Ref. *Semaine médicale* 1897. p. 405.

Arbeit aber über dieses Thema verlief nicht ohne bedeutende Schwierigkeiten, so dass ich mich nur jetzt dazu entschlossen habe, eine ausführlichere Berichtigung meiner Experimente darzugeben.

Pathogenität der Influenzabacillen.

Wie bekannt, besitzen die Influenzabacillen grosse Pathogenität für alle die Versuchsthiere; Kaninchen reagiren nur gegenüber von sehr hohen Dosen von Influenzaculturen, wenn sie aus den üblichen Bahnen geimpft werden; und wenn auch die Thiere in Folge der Einspritzung zu Grunde gehen, findet keine Vermehrung der Bakterien im Thierorganismus statt; der Tod ist vielmehr Intoxicationsercheinungen zuzuschreiben. Wenn die Einspritzung der Influenzabacillen ins Gehirn stattfindet, tritt eine starke locale Vermehrung der injicirten Mikroben zu Tage, und nur durch diese Impfmethode gelingt es, die Virulenz eines Culturstamms, wenn nicht bedeutend, zu steigern.¹

Ins Peritoneum geimpft reagiren kleine Meerschweinchen (200 bis 300^{gramm}) sehr gut; grössere dagegen zeigen oft eine höhere Resistenz; über die grossen Virulenzschwankungen, ja selbst bei einem selben Culturstamme, wird von vielen Autoren hingewiesen. Auch die Resistenz der Thiere ist oft eine sehr verschiedene. Bei der Autopsie von den an Influenza acut eingegangenen Meerschweinchen findet man die Zeichen einer Peritonitis mit blutig serösem Exsudate, in welchem Eiterflocken herumschwimmen; ein gleiches Exsudat findet man gewöhnlich auch in den Pleurahöhlen und im Pericard; hier nimmt das Exsudat oft ein gallertartiges Aussehen an. Manchmal, wenn die Culturen eine ziemlich starke Virulenz besitzen, kann man auch subcutan an der Stelle der Impfung eine nicht sehr diffuse gallertartige Infiltration bemerken. Die Organe der eingegangenen Thiere sind immer stark hyperämisiert; die Nierenkapseln haben oft ein hämorrhagisches Aussehen, die Leber und die Milz sind oft von einem dicken, gelben, fibrinartigen Eiter durchzogen. In den oben verzeichneten Exsudaten tritt eine starke Vermehrung der Influenzabacillen ein; im Blute kann man, wenn man virulenteren Culturen anwendet, sehr oft durch das culturelle Verfahren ziemlich grosse Mengen von Bacillen nachweisen; bei einigen Influenzastämmen, die ihre Virulenz nicht eingebüsst haben, ist die Septikämie eine constante Erscheinung.

Von den vielen Influenzaculturen, die ich in Händen zu haben die Gelegenheit hatte, erwies sich nur eine Cultur aus dem subcutanen Ge-

¹ A. Cantani, Wirkung der Influenzabacillen auf das Centralnervensystem. *Diese Zeitschrift*. 1896. Bd. XXIII.

webe in ziemlich kleinen Dosen für Meerschweinchen virulent ($\frac{1}{4}$ Agar-cultur). In der Regel aber soll man viel grössere Dosen subcutan einspritzen (1 Cultur), um den Tod bei den Experimentthieren zu verursachen. Die intraperitoneale Einspritzung ist dagegen eine ziemlich sichere und ist oft auch in kleinen Dosen ($\frac{1}{10}$ Oese) wirksam.

Hunde vertragen sehr hohe Dosen (50 bis 60 Agarculturen) sehr gut, wenn die Impfung ins Peritoneum oder subcutan ausgeführt wird; einer intravenösen Einspritzung gegenüber zeigen sich diese Thiere etwas mehr empfänglich; ins Gehirn eingespritzt, vermehren sich die I.B.¹ bei diesen Thieren sehr gut.

Die Culturen, die ich für meine Versuche benutzte, stammten in der Mehrzahl aus typisch verlaufenen Influenzafällen; da aber die Influenza-epidemien in Neapel in diesen letzten Jahren einen fast immer gutartigen Charakter zeigten, gelang es mir ziemlich schwer, virulente Culturen zu isoliren. Die höchste Virulenz von meinen Culturen betrug $\frac{1}{10}$ von einer normalen Oese einer 24stündigen Cultur auf Voges'schem Blutagar, intraperitoneal; ich konnte aber nur selten mit Culturen arbeiten, die eine solche Virulenz zu entfalten im Stande waren, was mir bedeutende Schwierigkeiten machte. Es gelang mir auch sehr schwer die Virulenz von meinen Culturen längere Zeit hindurch constant zu behalten; ich wurde nämlich gezwungen, viele Thierpassagen zu diesem Zwecke auszuführen. Die besten Erfolge wurden von mir bei dieser Gelegenheit mittels intrachranischen Einspritzungen bei Kaninchen erzielt. Auch aus den Auswürfen von Phthisikern konnte ich nicht selten relativ starke virulente Stämme erhalten. Ich wurde nämlich gezwungen, im Sommer diese Quelle zu benutzen, um immer frische Culturen gebrauchen zu können.

Was die von mir gebrauchte Züchtungsmethode anbelangt, eignete sich für meine Zwecke am Besten das von Voges vorgeschlagene Blutagar-material, auf welchem die I.B. am üppigsten wachsen, obwohl dessen Herstellung eine ziemlich grosse Mühe verlangt. Ueber die Einzelheiten, dieses Material zu bereiten, will ich der Kürze wegen nicht näher eingehen; ich verweise bei dieser Gelegenheit auf meine früheren Angaben und auf diejenigen, die von Voges selbst veröffentlicht wurden.²

Die Immunisirungsversuche sind aus allen den oben citirten Angaben sehr mühsam; die Bereitung in grossen Mengen eines sterilen Nährbodens, die Mangel an Virulenz von vielen Influenzastämmen, die grossen Virulenzschwankungen bei einem selben Culturstamme, die schnelle Verringerung der Virulenz, ja selbst bei anfänglich stark virulenten Culturen, die ausser-

¹ I.B. = Abkürzung für Influenzabacillen.

² *Deutsche med. Wochenschrift*. 1894.

ordentliche Mortalität der Thiere während der Immunisirung sind alles Schwierigkeiten, die man nur durch eine Jahre lang fortgesetzte methodische Arbeit überwinden kann; und wenn auch die Resultate nicht so glänzend ausfallen, sind sie doch immer, wenn man alle Hindernisse betrachtet, die man zu überwinden hat, nicht so gering zu schätzen.

Immunisirungsmethode.

Die Thiere, die ich zu den Immunisirungszwecken wählte, waren Kaninchen, Meerschweinchen, Hunde. Was die ersteren anbetrifft, so muss ich schon im Voraus offen gestehen, dass alle die zahlreich mit verschiedenen Methoden in verschiedenen Zwischenräumen unternommenen Experimente ansichtslos missglückt sind, und doch war die Zahl der dieser Behandlung unterworfenen Kaninchen eine ziemlich hohe (27 Thiere). Die höchste Bakterienmasse wurde von einem Kaninchen getragen, dem ich binnen drei Monaten 76 sterilisirte Influenzaagarculturen in die Bauchhöhle mit progressivem Steigen der Dosen einspritzte; das Thier ging aber nach der letzten Einspritzung von 18 Culturen in 9 Tagen an Marasmus zu Grunde.

Wie aus diesen Experimenten hervorgeht, besitzen die Influenza-bacillen eine sehr ausgeprägte toxische Wirkung auf den Kaninchen-organismus, die eine starke Kachexie hervorruft; wenn man das sterilisirte Bakterienmaterial ins Gehirn direct einspritzt, so genügen oft viel kleinere Dosen, wenn aber wiederholt, um neben den mannigfaltigen nervösen Symptomen denselben Marasmus hervorzubringen, wie bei subcutaner oder intraperitonealer Einspritzung von viel höheren Dosen.

Einer genaueren Beschreibung sind die bei Meerschweinchen ausgeführten Immunisirungsversuche würdig. Die Immunisirung wurde mit lebendigen oder sterilisirten Culturen, oder auch mit sterilisirtem Materiale, welches aus Thieren gewonnen wurde, welche an Influenza gestorben waren, vollbracht.

Was die Experimente anbelangt, die mit lebendigen Culturen ausgeführt worden sind, so muss ich auch hier viele Misserfolge erwähnen; obwohl ich fast immer Culturen angewendet habe, die durch 4- bis 5 tagesiges Stehen bei Zimmertemperatur ihre Virulenz in hohem Grade eingebüsst hatten, vertrugen die Thiere solche wiederholte Einspritzungen ins Peritoneum sehr schlecht. Von elf Meerschweinchen, die dieser Behandlung unterworfen wurden, kam kein einziges sehr weit; das widerstandsfähigste Thier vertrug im Laufe von 40 Tagen 20 lebendige Culturen und starb doch nach der letzten Einspritzung von 8 Culturen in 20 Stunden. Alle die so behandelten Thiere zeigten bei der Autopsie die Zeichen einer chronischen stark adhäsiven Peritonitis. Da einige von diesen Versuchen

Beispiel von intraperitoneal mit steigenden Dosen von lebendigen Influenzabacillen behandelten Meerschweinchen.

Tabelle I.

I m m u n i s i r u n g s - B e h a n d l u n g					C o n t r o l e				
Nummer	Datum der Injectionen	Gewicht in grm	Intraperiton. Dosis der Influenza-cultur	Verlauf	Section	Nummer	Gewicht in grm	Intraperiton. Dosis der Influenza-cultur	Verlauf u. Section
687	30. Juni	310	1/2 Cultur	schwer krank		627	350	1 Cultur	+ 20 Stunden Reineult.v.I.B.
	9. Juli	300	1 "	leicht krank					" "
	15. "	270	2 Culturen	—		639	280	2 Culturen	" "
	30. "	270	3 "	—		644	400	1/4 Cultur	" "
	10. August	270	5 "	+ 48 Stunden	starke adhäsive Peritonitis, Reinculturen von IB.	679	280	1/4 "	" "
625	29. Juni	270	1 Cultur von 4 Tagen	—					
	1. Juli	260	1 v. 5 Tagen	—					
	8. "	250	2 "	—					
	15. "	270	3 "	—					
	30. "	300	3 "	—					
	10. August	290	5 "	—					
	25. "	290	3 24std. Cult.	—		707	260	1/2 Cultur	" "
	5. Septbr.	290	5 "	+ 3 Tagen	starke adhäsive Peritonitis, spärliche IB.	749	270	1/2 "	" "

denen von Delius und Kolle sehr ähnlich sind, so will ich ein Beispiel von diesen Experimenten hier kurz wiedergeben (Tabelle I). Auch hier widerstanden die Thiere einer 6- bis 12fach tödtlichen Dosis, gingen aber nach einer höheren Dosis schnell zu Grunde. Die chronische Peritonitis, die man bei ihnen beobachtete, zeigte gerade, dass sie nie eine echte Immunisirung erworben hatten, sondern nur eine erhöhte peritoneale Resistenz gegen tödtliche Dosen von Influenzabacillen.

Ich versuchte nun mit sterilisirten Culturen; um aber die wiederholten Reizerscheinungen im Peritoneum zu vermeiden, behandelte ich von nun an alle Thiere subcutan und spritzte sie in die Bauchhöhle nur zuletzt und diesmal mit einer vielfach tödtlichen lebendigen Culturmasse, um den Immunisierungsgrad der Thiere etwas genauer zu bestimmen. In dieser Weise glaube ich auch viele Einwände ausschalten zu können, die man gegen die Auffassung einer echten Immunisirung zu Gunsten einer erhöhten localen Resistenz der Thiere hätte machen können.

26 Meerschweinchen wurden in dieser Weise behandelt; die zur Behandlung angewendeten Culturen wurden bei 56° eine halbe Stunde sterilisirt; wie gesagt, wurden zur Immunisationsprüfung immer lebendige Culturen angewendet, deren Virulenz ich so viel als möglich zu steigern versuchte; da man von einer genauen minimal tödtlichen Dosis von Influenza bei Meerschweinchen wegen der Resistenzschwankungen der verschiedenen Thiere nicht sprechen kann, wurden immer zur Immunisationsprüfung vielfach tödtliche Dosen angewendet. Wie ich schon oben gesagt habe, wurde die Vorbehandlung mit sterilisirten Culturen immer auf dem subcutanen Wege vollbracht; der Immunisationsgrad mit lebendigen Influenzabacillen wurde dagegen mittels intraperitonealer Einspritzung geprüft.

Dass viele Thiere während der Behandlung zum Opfer fielen, brauche ich hier nicht besonders zu erwähnen. Die Mortalität bei meinen Thieren war aber nicht eine ausserordentlich grosse, denn es gelang mir bei dieser Behandlung, eine verhältnissmässig hohe Zahl von Thieren am Leben zu erhalten.

Die subcutane Vorbehandlung wird von den meisten Thieren ziemlich gut vertragen; nur selten verursachten die Injectionen Abscesse, und wenn auch dies geschah, gingen letztere fast immer ziemlich schnell in Heilung über.¹ Die Thiere fieberten nach den ersten Injectionen (1 bis 1½ Grad), zeigten ein Paar Tage nachher Mattigkeit, Fressunlust, Gewichtsabnahme,

¹ Die Bildung von Abscessen erwies sich bei einigen Thieren als bedeutend störend für die Erzeugung einer Immunisirung, so dass ich es fast immer vorgezogen habe, solche Thiere aus meinen Versuchen ganz auszuschalten.

Tabelle II.
Beispiel für die schützende Wirkung einer einzigen subcutanen Einspritzung von sterilisirten Influenzabacillen.

V o r b e h a n d l u n g				I m m u n i t ä t s p r ü f u n g				
Nr.	Thier	Gewicht in Gramm	Datum	Subcutane Dosis	Datum	Intraperitoneale Dosis	Verlauf	Autopsie
494	Meersch.	320	3. V.	3 bekommt subcutan sterilisirte Agarculturen	6. V.	4 lebendige Culturen	† 48 Stunden	Reinculturen von IB.
495	"	320	"	desgl.	"	4 "	† 28 Tage	Organe steril.
496	"	250	"	desgl.	"	4 "	† 48 Stunden	Reinculturen von IB.
543	"	260	7. V.	subcutan 8 ^{com} von sterilisirter 24stündiger Cultur in Blutbouillon.	10. V.	5 "	† 48 "	" "
544	"	310	"	desgl.	"	4 "	† 48 "	" "
541	"	235	"	desgl.	"	5 "	lebt	" "
C o n t r o l e.								
539	Meersch.	200		unbehandeltes Controlthier	6. V.	1/2 Agarcultur	† 20 Stunden	Reinculturen von IB.
540	"	300		" "	10. V.	1/2 "	† 20 "	" "

erholten sich in 5 bis 6 Tagen schon wieder, falls sie nicht zu Grunde gingen.

Bei einer ersten Reihe von Experimenten habe ich es vor Allem versucht, ob es möglich wäre, durch eine einzige subcutane Einspritzung von sterilisirten Influenzabacillen den Thieren einen Schutz gegen die intraperitoneale Impfung von einer vielfach tödlichen Culturmasse verleihen zu können. Wie aus der Tabelle II ersichtlich, zeigte sich von 6 Thieren nur ein einziges gegen eine 10fach tödtliche Dosis resistent; ein anderes Thier starb nach 28 Tagen unter Kachexiesymptomen, bei den übrigen trat der Tod nach 48 Stunden ein.

Die Vorbehandlung mit wiederholten Einspritzungen von immer steigenden Dosen von sterilisirtem Material gab mir bessere Erfolge; ich habe bei 20 Thieren eine solche Behandlung eingeleitet; wenn man die Misserfolge ausschaltet, die man immer bei den ersten Versuchsthieren bekommt wegen mangelhafter Erfahrung, so kann man sich mit den erhaltenen Resultaten als ziemlich befriedigt erweisen. Die Immunisirung gelang mir an 5 Thieren ziemlich gut; ich erlaube mir daher die Protokolle von diesen Experimenten in Tabelle III vorzuführen.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, bekam Meerschweinchen 551 168 sterilisirte Culturen subcutan im Laufe von 7 Monaten; Meerschweinchen 565 die durchaus grosse Menge von 181 Culturen in 4 Monaten; die höchste subcutane Einspritzung von sterilisirtem Materiale war bei dem einen von 20, bei dem anderen von 40 Agaculturen. Zur intraperitonealen Immunisationsprüfung bekam Meerschweinchen 551 19 lebendige Culturen, die eine Virulenz von $\frac{1}{8}$ Cultur besass, Meerschweinchen 565 8 lebendige Culturen, deren minimal tödtliche Dosis $\frac{1}{10}$ Cultur betrug. Diese Thiere haben daher eine ungefähr 100fach tödtliche Dosis gut ertragen. Ich hätte auch höhere Dosen injicirt, wenn ich nicht gefürchtet hätte, mit der Einspritzung in die Bauchhöhle von so grossen Culturmassen eine mechanische locale Schädigung zu verursachen, die an und für sich selbst den Tod hätte hervorrufen können.

Ueber die specifische Bedeutung der erhaltenen Immunität wird weiter bei der Gelegenheit der Serumuntersuchungen berichtet werden; ich will es aber nicht unterlassen, hier einige Versuche mitzutheilen, die ich Anfangs als Controle für meine Immunisirungsbehandlung als unentbehrlich hielt.

Dass die Vorbehandlung mit fremden Bakterienarten eine vorübergehende Resistenz gegen die Einverleibung eines anderen Bacteriums hervorrufen kann, wurde durch die Experimente von verschiedenen Autoren (Pfeiffer, Klein u. A.) in sehr klarer Weise nachgewiesen. Bei meinen Experimenten hätte man daher auch an einer erhöhten nicht specifischen Resistenz Seitens der Thiere denken können. Schon aber durch die Aus-

Tabelle III.
Beispiel von positiven Immunisierungsversuchen mittels subcutaner Vorbehandlung mit steigenden Mengen von sterilisirten Influenzabacillen.

V o r b e h a n d l u n g			I m m u n i t ä t s p r ü f u n g			C o n t r o l e					
Nr.	Thier	Gewicht in g	Subcutane Dosis	Intraperiton. Dosis	Ver- lauf	Nr.	Gewicht in g	Datum	Intraper. Dosis	Verlauf	Section- befund
685	Meersch.	270	Vorbehandelt mit 15 sterilisirten Agar- culturen im Laufe von 2 Monaten; nach der letzten Einspritzung von 8 steril. Culturen bekommt es 15 Tage später	5 leb. Agar- culturen	lebt	797	210	5. VI.	1/8 Cultur	+ 24 Std.	Reinculturen von Influenzabacillen.
509	"	240	Vorbehandelt mit 21 sterilisirten Agar- culturen im Laufe von 25 Tagen; nach der letzten Einspritzung von 5 steril. Culturen bekommt es 7 Tage später	5 "	"	589	200	4. V.	1/2 "	+ 20 Std.	
600	"	585	Vorbehandelt mit 75 sterilisirten Agar- culturen im Laufe von 3 Monaten; nach der letzten Einspritzung von 30 steril. Culturen bekommt es 7 Tage später	10 "	"	621	400	28. V.	1/4 "	+ 20 Std.	
551	"	440	Vorbehandelt mit 168 sterilisirten Agar- culturen im Laufe von 7 Monaten; nach der letzten Einspritzung von 20 steril. Culturen bekommt es 20 Tage später	13 "	"	731	400		1/8 "	+ 20 Std.	
323 * 565	"	450	Vorbehandelt mit 181 sterilisirten Agar- culturen im Laufe von 4 Monaten; nach der letzten Einspritzung von 40 steril. Agarculturen bekommt es 16 Tage später intraperitoneal.	8 "	"	678 677	350 400		1/10 " 1/8 "	+ 20 Std. + 24 Std.	

föhrungsweise von meinen Versuchen wurde diese M6glichkeit ganz ausgeschlossen, denn wöhrend ich die subcutane Behandlung für die Immunisation wöhlte, prüfte ich den erreichten Immunitätsgrad auf dem peritonealen Wege; von einer örtlichen Resistenz der Thiere ist darum bei meinen Experimenten kaum zu sprechen. Einige von meinen behandelten Thieren widerstanden übrigen eine so hohen tödtlichen Dosis, dass man kaum berechtigt ist, Zweifel über die Specificität der Immunisirung zu hegen. Es wäre daher ganz überflüssig, noch andere Worte über diese Frage weiter zu spenden; da ich aber bei einigen Controluntersuchungen, die ich in diesem Sinne anstellte, einige Unterschiede in der Resistenz der Thiere gegen die intraperitoneale Einverleibung von Influenzabacillen bemerken konnte, je nachdem sie aus dem subcutanen oder aus dem peritonealen Wege vorbehandelt waren, so glaube ich, ist es nicht ohne Interesse, auch über die Einzelheiten von diesem Experimente kurz zu referiren.

Ich benutzte zu diesem Zwecke zwei Meerschweinchen von 300^{grm} Gewicht, die mit sterilisirten Typhusculturen, das eine subcutan, das andere intraperitoneal vorbehandelt wurden. Nach vier Einspritzungen von complexiv 3 Agarculturen, spritzte ich sie beide intraperitoneal mit einer dreifach tödtlichen Dosis von Influenza. Meerschweinchen a, welches subcutan vorbehandelt war, starb in Folge der intraperitonealen Einspritzung von Influenza schon nach 20 Stunden mit allen Zeichen einer reinen Infection; Meerschweinchen b, welches intraperitoneal mit Typhus vorbehandelt war und dadurch eine erhöhte peritoneale Resistenz erworben hatte, blieb dagegen am Leben. Ein drittes Meerschweinchen, welches mit Typhus intraperitoneal vorbehandelt war, starb nach einer Einspritzung von 5 tödtlichen Dosen von Influenza in 48 Stunden, während das Controlthier schon nach 20 Stunden zu Grunde ging.

Wir können aus diesen Experimenten vor Allem schliessen, dass sich eine erhöhte Resistenz der Thiere nur dann einstellt, wenn die Thiere durch dieselbe Impfbahn behandelt werden; wenn man aber darauf achtet, die letzte Injection auf anderem Wege auszuführen, dann sind die Resultate schon verschieden. In allen Fällen ist die erworbene Resistenz der Thiere nicht eine sehr hohe, da die Thiere nur gegen 2 bis 3 Mal tödtlichen Dosen geschützt werden und nach höheren Dosen sicher zu Grunde gehen.

Die Immunisirungsversuche wurden auch mit anderem Materiale vollbracht; bei einer ersten Serie von Thieren habe ich manchmal mit Erfolg als Vaccine die sterilisirten Exsudate von an Influenza eingegangenen Meerschweinchen gebraucht. Von vier Meerschweinchen, die ich so behandelte, gingen zwei zu Grunde, zwei widerstanden einer ziemlich hohen tödtlichen Dosis (5 Agarculturen = 10fach tödtliche Dosis). Auch diese Experimente werden in der Tabelle IV kurz zusammengefasst.

Tabelle IV.
Beispiel von Immunisierungsversuchen mittels Vorbehandlung mit sterilisierten Exsudaten, welche aus Influenza-
Meerschweinchen stammen.

V o r b e h a n d l u n g				I m m u n i t ä t s p r ü f u n g		
Nummer	Thier	Gewicht in grm	Subcutane Dosis	Intraperiton. Dosis	Verlauf	Section
529	Meerschw.	270	Vorbehandelt mit einer einzigen Einspritzung von 3 ^{cem} Pertonealexsudat, welches zahlreiche Influenzabacillen enthielt; 11 Tage später bekommt es	6 ^{cem} leb. I.B.-Cultur in Blutbouillon	+ 24 Std.	Reincultur von I.B.
524	"	270	Vorbehandelt mit 8 ^{cem} Influenzabacillenexsudat in zwei Malen im Laufe von 5 Tagen; 11 Tage später bekommt es	"	"	"
570	"	320	Vorbehandelt mit einer einzigen subcutanen Einspritzung von 5 ^{cem} Pertonealexsudat; bekommt 11 Tage später	5 Agarculturen	lebt	
518	"	290	Vorbehandelt mit zwei subcutanen Einspritzungen von je 4 ^{cem} Pertonealexsudat; bekommt 6 Tage später	"	"	
C o n t r o l l e.						
579	Meerschw.	200	Unbehandeltes Controlthier	1/2 Agarcultur	+ 20 Std.	Reincultur von I.B.
540	"	300	"	1/2 "	"	"

Da sich die Influenzabacillen in den Nervencentren der intracranisch eingespritzten Thiere sehr gut vermehren, versuchte ich bei einer anderen Experimentenreihe auch dieses Material für meine Immunisirungsversuche zu benutzen. Zu diesem Zwecke wurden Kaninchen tödtliche Dosen von Influenzaculturen ins Gehirn direct eingespritzt; gleich nach ihrem Tode wurde in steriler Weise das Gehirn entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung in der Proportion von 1:10 emulsionirt, und dann eine halbe Stunde bei 56° sterilisirt.

Die Zahl der in dieser Weise subcutan behandelten Meerschweinchen war von 24 mit 11 positiven Erfolgen. Einige von den am Leben gebliebenen Thieren überstanden die intraperitoneale Einspritzung von Influenza schon nach einer einzigen subcutanen Injection von Influenzagehirnemulsion. Die höchste Resistenz gegenüber der Einverleibung von Influenza zeigte Meerschweinchen 399, welches nach der Behandlung 6 lebendige Influenzaculturen, d. h. eine 48 Mal tödtliche Dosis gut vertrug. Auch hier sind die Misserfolge verhältnissmässig zahlreich; weshalb einige Gehirnemulsionen von Influenzakaninchen als ein sehr gutes Vaccin sich bewährten, während andere als unfähig sich erwiesen, können wir vielleicht durch die Unterschiede erklären, die in der Vermehrung der Bacillen im lebendigen Gehirne der Thiere sich bewerkstelligten. In der Regel war die Entwicklung der Influenzabacillen zahlreicher, wenn die gebrauchten Culturen eine höhere Virulenz besaßen, und die aus diesen Thieren gewonnenen Emulsionen erwiesen sich auch aktiver. Die subcutanen Einspritzungen von sterilisirten Gehirnemulsionen wurden in der Regel von den Thieren gut getragen; nur selten verursachten sie Abscesse; wenn dies der Fall war, wurden die Thiere ohne Weiteres geopfert; denn, wie ich schon früher betont habe, verhindert die Abscessbildung bedeutend die Absorption des injicirten Materials. Und in der That zeigten diese Thiere fast immer eine minderwerthige oder gar keine Immunität, so dass ich sie als unbrauchbar für eine weitere Behandlung hielt.

In der Tabelle V werden die Resultate von diesen Experimenten kurz zusammengefasst; es wurden auch einige Controluntersuchungen mittels Behandlung der Thiere mit normaler Gehirnemulsion angestellt; über deren negativen Resultate in derselben Tabelle V zuletzt kurz referirt wird.

Da sich normale Gehirnemulsionen als ein sehr guter Nährboden für die Influenzabacillen erwiesen hatten, so benutzte ich auch dieses Material zu Immunisirungszwecken. Ich cultivirte ganz einfach die Influenzabacillen in Emulsionen von normalen Kaninchengehirnen, die ich in steriler Weise solirte; die Emulsionen, die in physiologischer Kochsalzlösung ausgefertigt wurden, liess ich von der Impfung mit Influenzabacillen

Tabelle V.
Immunisierungsversuche mittels Einspritzungen von sterilisirten Gehirneinmulsionen aus intracranisch mit Influenza-
bacillen eingespritzten Kaninchen.

Nummer	Thier	Gewicht in gmm	Subcutane Vorbehandlung	Intraperitoneale Immunitätsprüfung			Nummer	Gewicht in gmm	C o n t r o l e		Section		
				Dosis	Verlauf	Verlauf			Intraperiton. Dosis	Verlauf			
401	Meerschweinchen	260	Vorbehandelt mit 3 ^{cem} Gehirneinulsion 1:10 in zwei Malen im Laufe von 11 Tagen; 7 Tage nach der letzten Einspritzung von 2 ^{cem} bekommt es	2 Agarcult.	lebt	424 425 426	245 230 240	1/8 1/8 1/4	Agarcultur " " " "	+ 20 Std. " " " "	Reinculturen von Influenzabacillen.		
403		330	Vorbehandelt mit 5 ^{cem} steril. Gehirneinulsion in 3 Einspr. Letzte Einspritzung 2.5 ^{cem} ; 7 Tage später	2 "	"								
399		310	Vorbehandelt mit 10 ^{cem} derselben Emulsion in 3 Einspr. Letzte Einspritzung 5 ^{cem} ; 7 Tage später	6 "	"	414 415	220 245	1/4 1/4	" " " "	" " " "			
398		310	Vorbehandelt mit 10 ^{cem} in einer Einspr.; 7 Tage später	2 "	"								
397		260	Vorbehandelt mit 20 ^{cem} in einer Einspr.; 7 Tage später	4 "	"								
407		350	Dieselbe Vorbehandlung; 7 Tage später	2 "	"		408 411	250 250	1/2 1/2	" " " "		" " " "	
537		390	Dasselbe Thier bekommt 15 Tage später	4 "	"								
359		350	Dieselbe Vorbehandlung; 7 Tage später	5 "	"								
458		300	Vorbehandelt mit 20 ^{cem} Gehirneinulsion in vier Einspritzungen; 12 Tage später	2 "	"								
470		290	Dieselbe Vorbehandlung; 7 Tage später	4 "	"		439	260	1/2	"		"	
473	280	15 ^{cem} Gehirneinulsion in 3 Einspritzg.; 9 Tage später	4 "	"									
		Dieselbe Vorbehandlung; 9 Tage später	5 "	"		493	260	1/4	"	"			
402		Vorbehandelt mit 20 ^{cem} norm. Emulsion; 7 Tage später	1 "	"	+ 20 Std.								
404		" " 10 "	1 "	"	+ 20 "								
405		" " 5 "	1 "	"	+ 24 "								

Tabelle VI.

Immunisierungsversuche mittels subcutaner Einspritzung von Influenzabacillenculturen in sterilisirten Gehirnemulsionen.

Nummer	Thier	Gewicht in grm	Subcutane Vorbehandlung	Immunitätsprüfung			C o n t r o l e				
				Intraperit. Dosis der I.B.	Verlauf	Sections- befund	Nummer	Gewicht in grm	Intraperit. Dosis	Verlauf	Sections- befund
461		220	Vorbehandelt mit einer einzigen subcutanen Einspritzung von 10 ^{cem} steriler I.B.-Cultur in normaler Gehirnemulsion 1:10. Bekommt 11 Tage später in's Peritoneum	6 Agarcult.	lebt		522	260	Agarcult.	+ 20 Std.	Rein- Culturen von I.B.
463	M e r s c h w e i n c h e n	320	Vorbehandelt mit einer einzigen subcutanen Einspritzung von 6 ^{cem} derselben I.B.-Cultur. 7 Tage später bekommt es in's Peritoneum	3 "	"		536	355	3 "	+ 20 "	"
							538	250	1 "	+ 36 "	"
							493	260	1/2 "	+ 20 "	"
488		270	Dasselbe Thier wird weiter behandelt und bekommt im Laufe von 2 Monaten 40 ^{cem} derselben Cultur; nach der letzten Einspritzung von 10 ^{cem} subcutan bekommt es in's Peritoneum	5 "	"						
489			Vorbehandelt mit einer einzigen Einspr. von 10 ^{cem} . 4 Tage später bekommt es in's Peritoneum	5 "	"						
472		330	Vorb. subcut. mit 5 ^{cem} u. intraper. mit	3 "	"	Rein- culturen von I.B.					
507		220	" " 32 " " "	5 "	+ 24 Std.						
522		280	" " 25 " " "	6 "	+ 24 "						
523		260	" " 20 " " "	5 "	+ 36 "						
		260	" " 20 " " "	6 "	+ 48 "						
			" " 20 " " "	6 "	+ 24 "						

$\frac{1}{2}$ Stunde bei 100° stehen. Die Influenzabacillen entwickelten sich auf diesem Nährboden sehr gut, so dass ich für meine Immunisirungszwecke dieses Material sehr gut benutzen konnte. Von acht so behandelten Meerschweinchen konnte ich bei vier eine ziemlich hohe Vaccination erreichen, wie aus der vorstehenden Tabelle (VI) ersichtlich ist.

Auch bei Hunden wurden einige Immunisirungsversuche angestellt. Wie bekannt, besitzen diese Thiere eine sehr hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber den Influenzabacillen; ich konnte daher den Immunitätsgrad bei den behandelten Thieren nicht so leicht schätzen, wie bei Meerschweinchen, die sich für Influenza weit empfänglicher zeigen. Ein Hund (1090) von 7^gm Gewicht bekam im Laufe von 3 Monaten 269 lebendige Blutagarculturen in's Peritoneum in immer steigenden Mengen; die letzte Injection betrug 70 lebendige Culturen und war für ein unbehandeltes Thier tödtlich.

Ein zweiter Hund (1681) von 10^{kg} Gewicht ertrug ohne besonderen Beschwerden im Laufe von 4 Monaten die ungeheure Menge von 455 lebendigen Agarculturen. Die letzte Injection betrug 150 Culturen.

Nach den hier vorgeführten Experimenten bleibt uns noch wenig übrig über die Immunisirungsmethoden zu sagen; wollen wir die Resultate zusammenfassen, so können wir aus dem eben Gesagten mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass es möglich ist, ähnlich wie bei anderen Infectionen, auch gegen Influenza eine experimentelle Immunisirung zu erreichen; und wenn man auch bei einer solchen Arbeit ziemlich viele Misserfolge zu rechnen hat, so kann man die oben citirte Möglichkeit nicht ausschliessen. Jeder, der mit Immunisirungsversuchen gearbeitet hat, weiss, wie es unmöglich ist, an's Ziel zu kommen, ohne auf dem Schlachtfelde unzählbare Opfer gelassen zu haben; und wenn dies bei fast allen den bekannten Mikroorganismen, die man leicht züchten und in ihren biologischen Eigenschaften ja oft mit mathematischer Genauigkeit verfolgen kann, der Fall ist, warum sollte es denn auch nicht mit den Influenzabacillen geschehen, bei welchen sich die Schwierigkeiten in viel grösserem Maasse ansammeln, als bei fast allen bekannten Bakterien?

Die Schutzimpfung, die wir bei einigen von unseren Versuchsthieren erreicht haben, war eine ziemlich hohe; es wurde nämlich die Dosis von 20 bis 40 sterilisirten Culturen subcutan gut vertragen; bei der peritonealen Immunisationsprüfung erreichte man bei einigen Meerschweinchen noch bessere Erfolge; ich konnte nämlich bis zu einer 100fach tödtlichen Dosis einspritzen, ohne dass die Thiere Beschwerden erlitten hätten. Wir können uns daher mit unseren Versuchen schon zufrieden erklären, da die von uns erzielte Immunisirung der Thiere diejenige weit übertrifft, die andere Autoren erreicht haben; Delius und Kolle konnten nämlich

bei ihren Versuchen eine 10fach tödtliche Dosis nie überschreiten; die höchste von Slatineano eingespritzte Bakterienmenge betrug 12 minimal tödtliche Dosen.

Was die Dauer der Schutzimpfung bei meinen Thieren anbelangt, so muss ich auch offen gestehen, dass ich nur bei wenigen dieselbe längere Zeit hindurch verfolgen konnte. Da mir nur bei kleinen Thieren die Immunisirung in ziemlich sicherer Weise gelang, so wurde ich gezwungen, viele von den immunisirten Meerschweinchen zu opfern, um die Serumprüfungen in einem ziemlich umfangreichen Maasse anstellen zu können. Ich prüfte daher nur bei drei Meerschweinchen die Dauer der Schutzimpfung; bei Meerschweinchen 461 (vgl. Tab. VI), bestand dieselbe nach einem Monate noch wie früher, so dass ich nach diesem Zeitraume eine intraperitoneale Injection von einer 50fach tödtlichen Dosis machen konnte.

Bei Meerschweinchen 399 (vgl. Tab. V) konnte ich ebenfalls nach 2 Monaten die Immunisirung noch unverändert wahrnehmen.

Meerschweinchen 407 (vgl. Tab. V) starb dagegen nach einer Einspritzung von 5 Culturen, die 3 Monate später nach der letzten Injection vorgenommen wurde.

Man kann aus den hier vorgeführten Experimenten nicht auf eine lange Dauer der erworbenen Immunität schliessen; da die Experimente aber nicht in grossem Maasse angestellt wurden, so kann man dieser letzten Schlussfolgerung nur einen geringen Werth für die Beurtheilung dieser Frage schenken.

Serumprüfung.

Bei meinen Immunisirungsversuchen habe ich, wie natürlich, die Serumprüfung bei den von mir behandelten Meerschweinchen nicht ausser Acht gelassen; ich achtete aber bei meinen Experimenten nicht nur darauf, die präventive oder heilende Wirkung Seitens des Serums der behandelten Thiere zu studiren, sondern auch und vor Allem jene specifischen Eigenschaften, die man im Serum von den immunisirten Thieren in letzter Zeit nachgewiesen hat, genau zu verfolgen.

Es war nämlich von grosser Wichtigkeit, die bakteriologischen und agglutinirenden Eigenschaften von meinen Sera etwas genauer zu studiren. Diese Experimente, die in letzter Zeit mit so grossem Erfolge ausgeführt wurden, kann man von den Begleiterscheinungen einer specifischen Immunität durchaus nicht trennen, wenn man auch im Serum selbst die heilwirkenden Substanzen nicht findet.

Pfeiffer'sches Phänomen.

Ueber die grundlegende Entdeckung von R. Pfeiffer, die sich als eine der wichtigsten Erscheinungen bewährt hat die im Serum von den immunisirten Thieren zu Tage tritt, brauchen wir nicht viele Worte zu spenden. Die von diesem genialen Autor festgestellten bakteriolytischen Erscheinungen, die sich im Organismus der immunisirten Thiere und in ihrem Serum selbst abspielen, sind von allen Seiten bestätigt worden; ich gebe daher ganz einfach die Resultate von meinen in diesem Sinne angestellten Experimenten.

Das Serum, welches ich für diese Experimente brauchte, stammte aus normalen Thieren, aus Thieren, die mit einer einzigen unschädlichen Influenzainjection vorbehandelt waren und endlich aus Thieren, die einen ziemlich hohen Immunitätsgrad erreicht hatten. Dieses Serum wurde in verschiedenen Mengen (1^{ccm} bis 0.2^{ccm}) zusammen mit einer sich der minimal tödtlichen Dosis sehr annähernden Menge oder mit einer tödtlichen Dosis von Influenzabacillen in die Bauchhöhle von kleinen Meerschweinchen eingespritzt. Die Exsudate wurden mittels Glaskapillaren in verschiedenen Zeitintervallen aus der Bauchhöhle gewonnen und mikroskopisch in frischen und gefärbten Präparaten untersucht. Die Bildung von Granula konnte man bei den so zarten Influenzabacillen besonders in ungefärbten Präparaten nur sehr schwer verfolgen; die Auflösung der Influenzabacillen geschah in so rapider Weise, dass man in den positiven Proben schon nach 10 bis 20 Minuten keine Bacillen mehr auffinden konnte. In der Tabelle VII werden einige von diesen Versuchen kurz zusammengefasst.

Wie aus den hier vorggeführten Experimenten hervorgeht, besitzt das Serum von normalen Kaninchen oder Meerschweinchen keine bakteriolytische Eigenschaft gegenüber den Influenzabacillen im Organismus von anderen Thieren; ebenfalls inactiv blieb das Serum von Thieren, die mit einer einzigen Influenzabacilleneinspritzung vorbehandelt wurden; eine sehr prägnante Auflösung der Influenzabacillen bemerkte man im Gegentheil in dem Serum von Thieren, die eine ziemlich hohe Immunisirung überstanden hatten.

Um die Resultate, was die Specificität der Serumwirkung anbelangt, etwas prägnanter zu gestalten, habe ich bei einer letzten Experimentenreihe den Thieren sammt den Influenzabacillen kleine Mengen von einer sehr wenig virulenten Diplokokkencultur intraperitoneal eingeführt. Die spezifische Wirkung des Immunserums trat in diesen Experimenten sehr schön ins Licht, wie aus der nächstfolgenden Tabelle (VIII) zu ersehen ist, denn während die Influenzabacillen schon nach wenigen Minuten aus dem Exsudate verschwunden waren, konnte man in der ersten Zeit eine

Tabelle VII.
Beispiel für die Prüfung des Pfeiffer'schen Phänomens bei normalen und immunisirten Thieren.

Serum liefernde Thiere			Prüfung des Pfeiffer'schen Phänomens										Bemerkungen
Nummer	Thier	Gewicht in grm	Vorbehandlung	Nummer	Thier	Gewicht in grm	Intraper. Dosis der Influenza-bacillen	Serumdosis in cem	Zeit der Entnahme des Exsudates nach	Zahl der Influenza-bacillen im Exsudate	Verlauf	Sections-befund	
458	Meerschweinchen	350	Vorbehandelt mit 20 ^{cem} ster. Gehirnemulsion aus einem intrachranisch mit I.B. behandelten Kaninchen. Entblutet 6 Tage nach der letzten Einspritzung von vier lebenden I.B.-Culturen.	501	Meerschweinchen	250	1/2 Cultur	0.25	4 Stunden	Exsudat steril	lebt	zahlreiche I.B.	Minimal tödtl. Dosis der I.B.-Cultur = 1/2 Cultur.
		502	290	1/2 "		0.25	10 "	"	"	"			
		340	290	1/2 "		0.5	20 "	zahlreiche I.B.	+ 24 Std.				
508	Meerschweinchen	300	Vorbehandelt mit 8 ^{cem} ster. Gehirnemulsion. Entblutet 4 Tage nach der letzten intraperitonealen Einspritzg. von 5 lebenden Agarculturen.	526	Meerschweinchen	280	1 1/2 "	0.5	2 "	Exsudat steril	lebt	zahlreiche I.B.	Minimal tödtl. Dosis 1/2 Cult.
		527	210	1 1/2 "		0.5	4 "	"	"	"			
		290	270	1 "		0.5	24 "	zahlreiche I.B.	+ 48 Std.				
	Kan.	1400	Unbehandeltes Kaninchen	474		300	1/2 "	1.0	20 "	"	+ 24 "		

Tabelle VIII.
Beispiel für die Specificität des Pfeiffer'schen Phänomens mittels gleichzeitiger Einspritzung von Influenzabacillen und Diplokokken.

Serum liefernde Thiere			Prüfung des Pfeiffer'schen Phänomens										Bemerkungen	
Nummer	Thier	Gewicht in grm	Vorbehandlung	Nummer	Thier	Gewicht in grm	Intraperiton. Dosis der I.B.	Intraperiton. Dosis der Diplokokken	Zeit der Entnahme des Exsudates nach	Zahl der Influenza- bacillen im Exsudat	Zahl der Diplo- kokken im Exsudat	Verlauf		Sections- befund
473	Meerschweinchen	280	Vorbehandelt mit 15 ^{cem} Influenzabacillen - Ge- hirnemulsion Immunisationsprüfung mit 5 ^{cem} leb. Influenza- bacillencultur Entblutet 7 Tage nach dieser letzten Ein- spritzung	513	Meerschweinchen	215	1/2 Cultur	1/10 ^{cem} von 24std. Ascites- bouillon	2 Stunden	keine	zahlreiche	lebt		Minimal tödtl. Dosis der Influenzabac- Cultur = 1/4 Cultur.
				514		215	"	"	4 "	"	"	"		
				516		280	"	"	10 "	"	"	"		
				517		240	"	"	24 "	"	noch viele	"		
474	Meerschweinchen	290	Unbehandeltes Con- trol-Meerschweinchen desgl.	512		250	"		10 "	zahlreiche		† 20 St.	zahlr. I.B.	
				511		230		1/10 D.	10 "		wenige keine	lebt		

Vermehrung der Diplokokken wahrnehmen. Die Diplokokken waren übrigens auch nach 24 Stunden im Peritonealexsudat in ziemlich grosser Menge zu beobachten.

Agglutination.

Was die agglutinirende Eigenschaften des Serum anbelangt, welches aus den immunisirten Thieren gewonnen wurde, so sollen wir mit grosser Vorsicht vorwärts schreiten, denn, wie ich schon bei anderer Gelegenheit betont habe¹, besitzt manchmal das normale Serum ein schwaches, wenn auch vorübergehendes Agglutinirungsvermögen gegenüber den Influenzabacillen. Es waren daher bei meinen Experimenten zahlreiche Controlversuche nöthig, um bei den normalen Sera diese Erscheinung etwas besser bestimmen zu können.

Die Agglutinationsversuche kann man mit Influenza sehr leicht ausführen, zu diesem Zwecke eignen sich aber die flüssigen Culturen nicht, denn die Gegenwart von Blut ist für die ganze Beobachtung sehr störend. Von Culturen auf festem Nährboden, die nach der Voges'schen Angabe bereitet werden (mit Blut vermischter Agar), gelingt es sehr leicht, eine ganz homogene Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung zu gewinnen; die Bacillen bleiben in letzterer sehr lange Zeit suspendirt, wenn man darauf achtet, nicht zu grosse Mengen von Influenzacultur zu gebrauchen. In der Regel genügten zwei Normalösen in 10^{cem} physiologischer Lösung vertheilt, um eine leicht opalescirende Flüssigkeit zu bereiten, die sich für die Agglutinationsversuche vortrefflich bewährte. Die Agglutinationsproben wurden in kleinen Glasröhrchen bei 37° gehalten. Um eventuelle Fehler auszuschliessen, habe ich für die Beurtheilung immer die makroskopische Untersuchung bevorzugt und das Mikroskop nur dann angewendet, wenn ich die erhaltenen Resultate controliren wollte. Da die Influenzabacillen keine Beweglichkeit besitzen, so hätte die einfache mikroskopische Beobachtung der Proben sehr leicht grobe Irrthümer bei der Schätzung der Resultate geben können.

Da die Sache vielleicht nicht ohne Interesse sein kann, will ich hier zuerst über einige von mir auf Menschen angestellten Versuche referiren. Ich studirte nämlich das Agglutinationsphänomen bei einem gesunden Manne, bei zwei acut verlaufenen Fällen von Influenzabronchitis, und endlich bei einem influenzaverdächtigen Falle, welcher aber keine Localisation zeigte. Auch bei einem sonst gesunden Manne, dem ich für andere Zwecke eine ganz kleine Menge von sterilisirter Influenzacultur subcutan einspritzte, prüfte ich die agglutinirende Wirkung des Serums.

¹ Sul reperto batteriologico nell' influenza. *Riforma medica*. 1900. Bd. XVI. Nr. 80, 81, 82.

Das Blut wurde bei allen Versuchen aus einer Armvene gewonnen, die Serumuntersuchung geschah immer 24 Stunden nach der Blutentnahme.

Tabelle IX.

Agglutinationsversuch bei einem kräftig gebauten Manne, Wärter in unserer Klinik. (38 Jahre alt.)

Dilution des Serum in der I.B.-Aufschw.	Nach 20 Minuten	Nach 2 Stunden	Nach 4 Stunden	Nach 24 Stunden	Bemerkungen
1 : 10	0	+	++	++	Das Optimum wird mit ++++ einverstanden, Flöckchenbildung mit + bis zu ++++. Aufklärung des Röhrchens mit ++++
1 : 20	0	0	0	0	
1 : 50	0	0	0	0	
1 : 100	0	0	0	0	

Tabelle X.

Agglutinationsversuch bei einem sonst gesunden Manne, dem subcutan 2 mg vor einer 1½ Stunde bei 56° sterilisirter Influenza-Cultur injicirt wurden (Schüttelfrost, Fieber bis 40°, Mattigkeit, Kopfschmerzen; nach 48 Stunden wieder gesund), Blutentnahme 2 Tage nach der Einspritzung von Influenzabacillen.

Dilution des Serum	Nach 20 Minuten	Nach 2 Stunden	Nach 4 Stunden	Nach 24 Stunden	Bemerkungen
1 : 10	+	++	+++	++++	Vollkommene Agglutination ++++
1 : 20	0	0	+	++	
1 : 50	0	0	0	0	

Tabelle XI.

Agglutinationsversuche bei zwei Fällen von Bronchopneumonitis, — Bei dem ersten (a) ergibt die Lungenuntersuchung diffuse Rasselgeräusche besonders an den Basen, Fieber 38°, grosse Mattigkeit. Zahlreiche Influenzabacillen im Sputum, fast in reiner Cultur. Dauer der Krankheit 14 Tage, ist seit 7 Tagen entfiebert (Blutentnahme). Bei dem anderen (b) dieselben Erscheinungen Seitens der Brustorgane, hat nur zwei Tage leicht gefiebert (37·5 bis 37·8), dann Temperatur unter der Norm (36·0 bis 35·6), Parese des linken Arms. Zahlreiche Influenzabacillen im Sputum — Blutentnahme 20 Tage nach dem Beginne der Krankheit.

Die Influenza-Culturen, welche für die Agglutinationsprobe benutzt werden, stammen aus dem Auswurfe selbst der beiden Kranken.

Dilution des Serum	N a c h				Bemerkungen
	20 Minuten	2 Stunden	4 Stunden	24 Stunden	
Serum a) 1:10	0	++	++	+++	Optimum
1:20	0	0	+	++	++++
Serum b) 1:10	0	0	0	0	
1:20	0	0	0	0	

Tabelle XII.

Agglutinationsversuch bei einem zehnjährigen Mädchen, welches seit 7 Tagen mit Schüttelfrost, hohem Fieber (40°) rheumatischen Schmerzen, Kopfschmerzen, Mattigkeit erkrankt ist. — Keine Localisation, kein Milztumor, keine gastrische Störungen — Entfiebert nach 7 Tagen — (Blutentnahme am 6. Tage des Fiebers).¹ — Agglutination auf Typhus und Coli negativ.

Dilution des Serum	N a c h				Bemerkungen
	20 Minuten	2 Stunden	4 Stunden	24 Stunden	
1:10	++	+++	++++	++++	Optimum
1:20	++	+++	++++	++++	++++
1:50	+	++	+++	++++	
1:100	0	+	++	++++	
1:200	0	0	+	+++	

Aus diesem zu kleinen Krankenmateriale können wir keine sicheren Schlüsse ziehen; wir können aber ohnehin im Serum von normalen Menschen eine schwache Agglutinationsfähigkeit anerkennen, welche aber Dilutionen von 1:10 bis 1:20 nicht zu übertreffen im Stande ist; bei dem sonst normalen Manne, der mit einer sehr kleinen Menge von sterilisirter Influenzabacillen-Cultur eingespritzt wurde, trat keine besondere Erhebung der normalen Agglutinationsfähigkeit ein; ebenfalls bei zwei charakteristischen Influenzafällen, bei denen vielleicht zu früh die Agglutination geprüft wurde. Ueber die positiven Resultate des letzten Falles wage ich keine Schlussfolgerungen zu ziehen, denn man konnte bei demselben wegen Mangels an irgend welcher Localisation nicht mit Sicherheit die Diagnose Influenza stellen. Vielleicht traf die positive Agglutination nicht aus reinem Zufalle zu; da aber dieser Fall der Privatpraxis gehörte, so wurde mir nicht erlaubt, weitere Forschungen zur endgültigen Lösung der Frage anzustellen. Jedenfalls scheint es mir, dass es sich sehr lohnen würde, weitere Studien über dieses ziemlich interessante Thema anzustellen.

Wie verhält sich nun das Serum von normalen Thieren? Ich untersuchte zu diesem Zwecke das Serum von vier normalen Meerschweinchen, drei Kaninchen und einem Hunde.

¹ Die bakter. Untersuchung des Blutes fiel negativ aus.

Tabelle XIII.

Agglutinationsversuche mit Serum von normalen Thieren.

Thier	Dilution d. Serum	N a c h				Bemerkungen
		20 Minuten	2 Stunden	4 Stunden	24 Stunden	
Meerschw. a)	1:10	0	0	0	0	Optimum
„ b)	1:10	0	+	++	+++	++++
„	1:20	0	+	++	+++	
„	1:50	0	0	0	0	
„ c)	1:20	+	++	+++	++++	
„	1:50	0	0	0	0	
„	1:100	0	0	0	0	
„ d)	1:50	0	0	0	0	
„	1:100	0	0	0	0	
Kaninchen a)	1:20	+	++	+++	++++	
„	1:50	0	0	0	+	
„	1:100	0	0	0	0	
„ b)	1:50	0	0	0	0	
„	1:100	0	0	0	0	
Hund a)	1:10	0	+	++	++++	
„	1:100	0	+	++	++++	
„	1:300	0	0	++	+++	
„	1:500	0	0	0	0	

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, besitzt das Serum von normalen Thieren manchmal eine schwache Agglutinationsfähigkeit, die bei Meerschweinchen und Kaninchen in der Proportion von 1:10 bis 1:20 zum Vorschein kommt; höhere Dilutionen bleiben fast immer ohne Erfolg. Von den Thiergattungen, die ich zu untersuchen Gelegenheit hatte, zeigte ein Hund eine ziemlich starke Agglutination in Proportionen bis zu 1:300.

Es ist merkwürdig, dass Slatineano bei seinen Agglutinationsversuchen mit Serum von immunisirten und normalen Thieren die agglutinirende Eigenschaften von einigen normalen Sera, die ich übrigens schon vor einigen Jahren in einer italienischen Zeitschrift¹ beschrieben habe, ganz übersah; wovon dies wohl abhängt, kann ich nicht sagen; bei meinen Versuchen konnte ich aber mehrmals beobachten, dass das normale Serum seine schwache Agglutinationsfähigkeit auf die Influenzabacillen nur kurze Zeit behält, denn oft bei dem Wiederholen nach einiger Zeit von Versuchen, die früher positiv ausgefallen waren, blieb die Agglutination völlig aus. Um diese Thatsache etwas besser in's Klare zu stellen, habe ich bei einem normalen Kaninchenserum die Agglutinationsproben in verschiedenen Zeitintervallen nach der Blutentnahme angestellt.

¹ *Riforma medica*. Bd. XVI. Nr. 80, 81, 82.

Tabelle XIV.
Agglutinationsversuche mit Serum von Thieren, die eine einzige Injection überstanden haben.

Nr.	Thier	Thiere, die das Serum geliefert haben				Agglutinationsversuche				Bemerkungen
		Menge der injicirten Influenzabacillen	Stelle der Injection	Zeit der Blutentnahme	Dilution	20 Min.	2 Std.	4 Std.	24 Std.	
762	Kaninchen	8 steril. Agarculturen	periton.	entblutet nach 2 Tagen	1:10	0	0	0	0	Optimum
767	"	5 " "	subcutan	" 2 "	1:10	0	0	0	0	+++ ,
786	"	5 " "	"	" 5 "	1:20	++	++	++	++	kleine Flock-
					1:50	0	0	+	++	chenbildung
					1:100	0	0	0	0	++ ,
788	"	5 " "	"	" 6 "	1:20	++	++	++	++	grosse Flock-
					1:50	0	0	0	0	chenbildung
					1:100	0	0	0	0	++ ,
787	"	5 " "	"	" 9 "	1:20	++	++	++	++	Aufklärung
					1:50	0	0	+	++	d. Flüssigkeit
763	Meerschw.	3 " "	periton.	" 8 "	1:100	0	0	0	0	+++ .
782	"	3 " "	subcutan	" 5 "	1:10	0	0	0	0	
					1:20	++	++	++	++	
					1:50	0	0	0	0	
770	"	3 " "	"	" 8 "	1:100	0	0	0	0	
					1:20	0	0	0	0	
					1:50	0	+	++	++	
784	"	3 " "	"	" 9 "	1:20	++	++	++	++	
					1:50	0	+	++	++	
					1:100	0	0	0	0	
1268	Hund	50 leb. Agarculturen	intraperit.	" 3 "	1:300	++	++	++	++	
					1:500	0	0	+	++	
					1:1000	0	0	0	0	

Tabelle XV.
Agglutinationsversuche mit Serum von immunisirten Thieren.

Behandlung der das Serum liefernden Thiere					Agglutinationsversuche				Bemerkungen	
Nr.	Thier	Subcutane Vorbehandlung	Letzte intraperit. Injection	Zeit der Blutentnahme	Dilution	20 Min.	2 Std.	4 Std.	24 Std.	
518	Meerschw.	Steril. Perit.-Exsudat	5 leb. I.B.-Culturen	entblutet nach 3 Tagen	1:50	+	+	+	+	Kleine Flockchen-
470	"	15 ster. I.B.-Gehirn-emulsionen	4 "	" 5 "	1:100	+	+	+	+	bildung
458	"	20 "	4 "	" 6 "	1:20	+	+	+	+	++.
551	"	168 ster. I.B.-Culturen	13 "	" 6 "	1:50	+	+	+	+	grosse Flockchen-
					1:100	+	+	+	+	bildung
					1:200	+	+	+	+	++.
					1:500	+	+	+	+	totale
					1:1000	+	+	+	+	Aufklärung
1090	Hund	229 "	70 "	" 21 Tagen	1:200	+	+	+	+	++.
					1:500	+	+	+	+	++.
					1:1000	+	+	+	+	++.
1681	"	455 "	150 "	" 6 "	1:10000	0	0	0	0	
					1:100	+	+	+	+	
					1:500	+	+	+	+	
					1:1000	0	+	+	+	
					1:5000	0	+	+	+	
					1:10000	0	+	+	+	

34*

Die Resultate entsprachen gar nicht meiner Erwartung, denn dasselbe Serum, welches 24 Stunden nach der Blutentnahme in einer Dilution von 1:10 positiv agglutinierte, nach 3 Tagen sein Agglutinationsvermögen ganz eingebüsst hatte.

In der vorstehenden Tabelle (Tab. XIV) werden nun die Experimente kurz zusammengefasst, die mit dem Serum von Thieren angestellt wurden, die einer einzigen Einspritzung von Influenzabacillen widerstanden hatten.

Wie aus der Tabelle XIV ersichtlich, ist eine einzige Einspritzung von ziemlich grossen Dosen von Influenzabacillen nicht im Stande, das natürliche Agglutinationsvermögen des Serums von diesen Thieren nur in geringem Grade zu steigern. Die Agglutination tritt in Dilutionen von 1:20 fast immer ein, wenn die Blutentnahme bei dem Thiere in der richtigen Zeit ausgeführt wird, vermag aber die Proportion 1:50 kaum zu erreichen. Wenn man die Thiere nur kurze Zeit (2 bis 3 Tage) nach der Einspritzung von Influenza entblutet, bemerkt man im Gegentheil eine Erniedrigung des natürlichen Agglutinationsvermögens; das Serum von diesen Thieren (Meerschweinchen 763, Kaninchen 762, 767) giebt auch in der starken Proportion von 1:10 negative Resultate.

Anders verhält sich das Serum von Thieren, die einem längeren Immunisirungsprocesse unterworfen werden; man kann ziemlich hohe Agglutinationswerthe erreichen, die oft in den Proportionen von 1:200 bis zu 1:500 zu Tage treten. In der Tabelle XV werden diese Experimente kurz zusammengefasst.

Um nun die Specificität der in dieser Tabelle vorgeführten Experimente etwas besser in's Licht zu stellen, habe ich noch einige Versuche angestellt, die in den nächsten Tabellen referirt werden.

Tabelle XVI.

Agglutinationsversuch auf Influenzabacillen mit Typhusimmunserum.

Serumlieferndes Thier			Agglutinationsprüfung					Be- merkungen
Nr.	Thier	Vorbehandlung	Dilution d. Serum	20 Min.	n a c h 2 Std.	4 Std.	24 Std.	
898	Kan.	Wird mit drei ster. Typhuscul- turen im Laufe von 12 Tagensub- cutan vorbehan- delt; 3 Tage nach der letzten Ein- spritzung von 1½ Cultur Blut- entnahme	1:10	+	++	+++	++++	Optimum ++++
			1:20	0	0	++	++	
			1:50	0	0	0	0	
			1:500	0	0	0	0	

Tabelle XVII.

Agglutinationsversuch auf Typhusbacillen mit Influenzaimmunserum.

Serumlieferndes Thier			Agglutinationsprüfung					Be- merkungen
Nr.	Thier	Vorbehandlung	Dilution d. Serums	20Min.	2 Std.	nach 4 Std.	24 Std.	
551	Meerschw.	168 sterilisirte Influenzabacillen- Culturen	1:10	0	+	++	+++	Optimum
			1:20	0	0	0	0	++++
			1:50	0	0	0	0	

Bei einem Kaninchen, welches mit Typhus vorbehandelt war, zeigte das Serum keine höhere Agglutinationsfähigkeit wie normales Kaninchen-serum; ebenfalls das Serum von einem mit Influenza vorbehandelten Meerschweinchen wirkte auf Typhusbacillen nicht agglutinierend.

Das Serum von mit Typhus vorbehandelten Thieren besitzt also kein höheres Agglutinationsvermögen wie das Serum von normalen Thieren gegenüber den Influenzabacillen. Ebenfalls zeigt das Serum von gegen Influenza immunisirten Thieren keine höhere Agglutinationsfähigkeit auf Typhusbacillen, wie normales Serum.

Aus allen den hier vorgeführten Experimenten können wir nun mit Sicherheit schliessen, dass im Serum von den Thieren, die gegen Influenza immunisirt werden, spezifische Veränderungen in sehr klarer Weise auftreten, die sich mit der Auflösung von den Influenzabacillen im Thier-organismus und mit einer ziemlich hohen Agglutinationsfähigkeit derselben in vitro kundgiebt.

Schützende Wirkung des Immunserums.

Wir wollen nun zuletzt auch einige Worte unseren Versuchen schenken, die wir zur Erzeugung einer passiven Immunität angestellt haben. Wie es selbstverständlich, treten gerade bei dieser Art von Versuchen die grössten Schwierigkeiten hervor; es ist gar nicht eine einfache Sache, ein Serum zu bereiten, welches einen sicheren Schutz gegen eine Infection gewährt, und alle Autoren, die mit solchen Experimenten gearbeitet haben, wissen, wie viele Hindernisse sich entgegenstellen, bis man das Ziel erreichen kann. Und wenn ich auch von dem positiven Ausfallen von den bakteriolytischen und agglutinirenden Versuchen, die mit grosser Wahrscheinlichkeit eine erste Vorstufe in den Immunisirungsvorgängen bilden, ermuthigt wurde, auch über die schützende Eigenschaft von meinen Sera die Versuche anzustellen, hegte ich schon im Voraus nicht grosse Hoffnungen auf diesen letzteren, da die Bedingungen für ein schützendes

oder heilwirkendes Serum sich viel complicirter gestalten, als diejenigen, die zur Erreichung eines einfachen Agglutininungsvermögens nöthig sind.

Viele von den in diesem Sinne angestellten Versuchen fielen schon vom Anfange negativ aus; oft zeigte das Serum eine ziemlich ausgeprägte Agglutination, war aber nicht im Stande, gegen eine 10- bis 20 mal tödtliche Dosis zu schützen. Ich konnte mich aber endlich nach vielen missglückten Versuchen von der Nothwendigkeit überzeugen, die Immunisirung viel höher treiben zu müssen und dieselbe mit möglichst frischen und virulenten Culturen auszuführen. Nur nachdem ich diese zwei Bedingungen in ziemlich hohem Maasse erfüllen konnte, war es mir möglich, einige günstige Resultate zu erhalten, die, wenn auch nicht sehr glänzend, mich doch für die Möglichkeit einer schützenden Wirkung Seitens des Immunserums mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen liessen.

Um die Experimente, die ich in dieser Richtung angestellt habe, ins richtige Licht zu setzen, soll hier kurz über das Verhalten von normalem Serum berichtet werden. Diesen Versuchen würde ich gerade nicht viele Worte schenken; da aber in der Arbeit von Delius und Kolle dem Serum von normalen Thieren eine wenn auch minimal schützende Kraft gegen die intraperitoneale Einverleibung von Influenzabacillen zugeschrieben wird, so glaube ich, dass es nicht ohne Interesse ist, auch einige von meinen Versuchen hier wiederzugeben, bei welchen es mir nie gelungen ist, eine solche protective Wirkung Seitens des normalen Serum beobachten zu können, obwohl ich zahlreiche Versuche zu diesem Zwecke angestellt habe; einmal geschah mir im Gegentheil, dass gerade die mit normalem Serum eingespritzten Thiere zu Grunde gingen, während die Controlthiere, die mit derselben Dosis von Influenza eingespritzt wurden, am Leben blieben. Einige von diesen Experimenten werden in der Tabelle XVIII kurz zusammengefasst.

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, schützt normales Serum von Kaninchen und Meerschweinchen gegen die gleichzeitige Einspritzung von tödtlichen Dosen von Influenzabacillen gar nicht; dem normalen Hundeserum kann man ebenfalls keine sicher schützende Wirkung zuschreiben. Vielleicht wurden bei diesen Versuchen die tödtlichen Dosen zu hoch gestalten; bei den meisten Experimenten war aber die Virulenz der angewendeten Culturen auch eine sehr schwache. Wie es nun sei, so können wir aus dem eben Gesagten dem normalen Serum keine Schutzwirkung gegen die gleichzeitige Einspritzung von Influenza zuschreiben.

Was die Experimente anbelangt, die mit Immunserum angestellt worden sind, so muss ich schon im Voraus offen gestehen, dass ich bei meinen ersten mit Meerschweinchen angestellten Versuchen sehr oft

Tabelle XVIII.

Beispiel für die schützende Kraft von normalem Serum gegen die intra-peritoneale Einspritzung von Influenzabacillen.

Thier, welches das Serum geliefert hat	Meerschweinchen, welchen das Serum injicirt wird					
	Nummer	Gewicht in grm	Intraperit. Dosis von I.B.-Cultur	Dosis des Serums in ccm	Verlauf	Sectionsbefund
Normales Kaninchen- serum	175	300	3 Oesen	1.0	† 20 Std.	Reincultur von I.B.
	196	300	2 „	0.5	† 20 „	„ „
	189	300	3 „	Controle	lebt	„ „
Normales Kaninchen- serum	427	225	9 Oesen	1.0	† 20 Std.	Reincultur von I.B.
	428	210	3 „	1.0	† 20 „	„ „
	434	210	1/4 „	Controle	† 20 „	„ „
Normales Meerschw.- serum	751	200	6 Oesen	2.5	† 20 Std.	Reincultur von I.B.
	752	220	3 „	0.25	† 20 „	„ „
	749	220	1/2 „	Controle	† 20 „	„ „
Hund, normal	1287	270	5 Oesen	1.0	† 20 Std.	Reincultur von I.B.
	1286	200	1 Oese	Controle	† 20 „	„ „
Hund, normal	1869	170	1 Oese	1 intraper.	† 20 Std.	Reincultur von I.B.
	1870	200	2 Oesen	1 „	† 20 „	„ „
	1871	330	2 „	1 subcutan	† 48 „	„ „
	1872	370	5 „	1 „	† 36 „	„ „
	1858	220	1/10 „	Controle	† 20 „	„ „

negative Erfolge erhalten habe. Auch bei jenen Thieren, die eine bedeutende Menge von Influenza gut vertragen hatten, konnte ich im Serum eine sehr schöne Agglutination bemerken, die schützende Kraft desselben aber war nur eine sehr geringe. Ich will hier nur ein Beispiel von einem Versuche vorführen, das ich bei Meerschweinchen 551 angestellt habe. Dieses Thier, wie aus der Tabelle III ersichtlich ist, widerstand einer 100 fach tödtlichen Dosis von Influenza. Das Serum zeigte eine sehr schöne Agglutination (Tab. XV), die in einer Dilution von 1:500 sehr schön ins Licht trat. Und doch war die schützende Kraft desselben Serum eine sehr geringe.

Tabelle XIX.

Beispiel für die schützende Kraft vom Serum von Meerschweinchen 551.

Serum lieferndes Thier Vorbehandlung	Meerschweinchen, welchen das Serum injicirt wird					
	Nummer	Gewicht in gm	Intraperit. Dosis von der I.B.	Intraperit. Dosis des Serums in cem	Verlauf	Sectionsbefund
Meerschw. 551 bekommt subcu- tan 168 sterile I.B.-Culturen in 14 Monaten. Blutentnahme 1 Tag nach der letzten Einspritz- ung von 13 leb. I.B.-Culturen.	742	300	3 Agarcult.	0.5	† 48 Std.	Culturen steril
	743	300	2 „	0.25	lebt	
	744	270	1 „	0.125	† 48 Std.	„ „
	745	220	1 „	0.25	lebt	
	746	250	1/2 „	0.125	„	
Unbehandeltes Controlthier	751	200	2 „	0.5	† 20 Std.	Reinculturen von I.B.
„	752	220	1 „	0.25	† 20 „	„ „
	749	220	1/2 „	Controle ohne Serum	† 20 „	Reinculturen von I.B.
	750	200	1/8 „	„	† 20 „	„ „

Das Serum von diesem Meerschweinchen war nicht im Stande, gegen eine 24 mal tödtliche Dosis in der ziemlich grossen Menge von 0.5^{cem} zu schützen; das so behandelte Thier starb aber erst nach 48 Stunden, bei der Section waren nur die Zeichen einer ziemlich hohen Hyperämie von allen Organen bemerkbar; kein Exsudat war in der Bauchhöhle vorhanden, die Culturversuche, die angestellt wurden, blieben alle steril. Bei Meerschweinchen 743, 745, 746 schützte die gleichzeitige Einspritzung von Immunserum gegen eine 4- bis 8- bis 16 fach tödtliche Dosis.

Meerschweinchen 744, welches eine Einspritzung von einer 8 mal tödtlichen Dosis intraperitoneal bekam, war nicht im Stande, einer so niedrigen Menge von Influenza zuwiderstehen.

Diese Resultate kann man gewiss nicht als brillant betrachten, die Wirkung des Serums ist bei diesen Versuchen eine sehr geringe, und auch ziemlich unbeständig; und doch waren diese Versuche die glücklichsten, denn alle anderen Experimente, die ich mit dem Serum von Thieren anstellte, die nicht so hoch wie Meerschweinchen 551 immunisirt waren, fielen noch viel schlechter aus.

Bei der Durchmusterung von allen diesen Experimenten, bei welchen die Resultate sich etwas günstiger bei den höher immunisirten Thieren

gestalteten und immer schlechter wurden, je nachdem die Thiere niedrigere Dosen von Influenza überstanden hatten, liess sich in klarer Weise schliessen, dass die Immunisirung bei meinen Thieren noch nicht so hoch getrieben war, um ein Serum erlangen zu können, welches positive Resultate in constanter Weise hätte liefern können. Die Fortsetzung von meinen Immunisirungsversuchen mit Meerschweinchen schien mir nun gar nicht geeignet, um etwas rascher ans Ziel zu gelangen. Es ist in der That gar nicht der Mühe werth, mit so kleinen Thieren zu arbeiten, um zuletzt, falls die Sache gut gelingt, eine so kleine Menge von Serum zu erlangen. Kaninchen widerstehen, wie gesagt, der Behandlung sehr schlecht; ich zog es vor, von nun an mit Hunden zu arbeiten, denn wie ich es schon am Anfange dieser Arbeit betont habe, vertrugen diese Thiere ja auch bedeutende Mengen von Influenzabacillen sehr gut. Ich achtete auch viel darauf, immer möglichst virulente Culturen anzuwenden; und zu diesem Zwecke schien es mir zweckmässig, bei jeder Einspritzung von Influenzabacillen, immer frisch aus Sputum isolirte Culturen zu gebrauchen, da es sich gar nicht lohnt, mit veralteten Culturen zu arbeiten.

Was die Behandlung der Thiere anbelangt, so sei hier vor Allem auf die Dauer derselben aufmerksam gemacht, die eine möglichst lange sein soll und auf die Menge des zu injicirenden Influenzabacillen-Materiales. Um ein actives Serum erlangen zu können, ist es angezeigt, sehr grosse Culturen einzupflegen; und diese ist vielleicht die grösste Schwierigkeit, die sich bei diesen Versuchen entgegenstellt; eine Impfung von mehr als hundert Influenzaculturen in einem Male ist eine gar nicht so leichte Sache, und doch sind solche und auch höhere Dosen durchaus erforderlich, um ein ziemlich actives Serum zu bekommen. Ich will hier nur in flüchtiger Weise auf die mühsame Arbeit hindeuten, welche für die Bereitung von so vielem Blutagarmateriale und für die Impfung desselben durchaus nöthig ist. Bei meinen Experimenten habe ich es nicht vorgezogen, mit Blutbouillen zu arbeiten, denn, abgesehen von der Schwierigkeit, die Blutbouillen in steriler Weise zu bereiten, hätte ich mehrere Liter derselben einimpfen müssen, um eine Menge von Influenzabacillen zu erlangen, die sich der grossen Menge von 150 Agarculturen, die ich meinem letzten Hunde in einem Male einspritzte, annähern konnte. Der Gebrauch von Petruschky-Schalen bietet dagegen sehr grosse Vortheile.

Die Influenzabacillen-Culturen, die für Hunde bestimmt sind, brauchen nicht sterilisirt zu werden, da sie von diesen Thieren sehr gut vertragen werden. Ich zog es vor, bei meinen Experimenten zur Vermeidung von Abscessen die Einspritzungen von Influenza in die Bauchhöhle direct auszuführen. Und nun erlaube ich mir, das Protokoll von einem von mir in letzter Zeit behandelten Hunde hier in kurzer Weise vorzuführen.

Tabelle XX.

Beispiel für das Immunisierungsprotokoll von Hund 1681, welcher mit Injectionen von Influenza in steigenden Dosen behandelt wurde.

Datum der Injectionen	Gewicht in kg	Intraperitoneale Dosis der Influenzabacillen	Verlauf	Sectionsbefund
7. I.	10.0	10 leb. Agarculturen	leicht krank	
25. I.	10.0	20 „ „	„ „	
8. II.	11.0	25 „ „	ganz wohl	
21. II.	11.0	50 „ „	„ „	
12. III.	11.500	80 „ „	„ „	
8. IV.	12.0	100 „ „	leicht krank nach 48 Std. wieder wohl	
4. V.	12.0	150 „ „ 450	desgl. Wird 6 Tage nach d. letzten Injection entblutet.	In der Bauchhöhle sehr geringe Menge von purul. Exsudate, Zeichen einer leicht adhäsiven Peritonitis, Organe etwas hyperämisch, Cult. steril.

Aus diesem Hunde, welcher ohne besondere Beschwerden die ziemlich grosse Menge von 450 Culturen im Laufe von ungefähr 4 Monaten als intraperitoneale Injection bekommen hatte (letzte Injection 150 Culturen), wurde das Blut 6 Tage nach der letzten Einspritzung entnommen. Das Serum besass sehr schöne agglutinirende Eigenschaften (vergl. Tab. XV). Auf seine schutzwirkende Kraft geprüft, gab es folgende Resultate.

Tabelle XXI.

Beispiel für die schützende Kraft des Serums von Hund 1681.
(Gleichzeitige intraperitoneale Injection von Serum und Influenzabacillen.)

Thier	Nr.	Gewicht in grm	Intraperiton. Dosis der Influenzabacillen	Intraperiton. Dosis des Serums in cem	Verlauf	Section
Meerschw.	1863	150	1 Oese	1	lebt	
„	1864	250	2 „	1	„	
„	1865	260	5 „	1	„	
„	1866	250	$\frac{1}{2}$ „	0.5	„	
„	1879	260	5 „	2	„	
„	1880	260	2 „	1	„	
„	1882	180	2 „	1	„	
„	1883	250	2 „	0.1	„	
„	1888	190	10 „	2	† nach 4 Tagen	Cultur steril

Tabelle XXII. (Fortsetzung.)

Controle.

Thier	Nr.	Gewicht in grm	Intraperiton. Dosis der Influenza- bacillen	Intraperiton. Dosis des Serums in cem.	Verlauf	Section
Meerschw.	1858	220	$\frac{1}{10}$ Oese		† 20 Std.	Reine Cultur
„	1869	170	1 „	1 ^{cem} Normal- serum	† 20 „	„
„	1870	200	2 „	1 „ „	† 20 „	„
„	1871	330	2 „	1 „ „	† 24 „	„
„	1872	370	5 „	1 „ „	† 48 „	„

Die Experimente, die in der Tab. XXI vorgeführt werden, sind viel besser ausgefallen, als diejenigen, die mit Immunserum, welches aus Meer-schweinchen stammte, angestellt worden sind. Ich konnte nämlich höhere Dosen und auch virulenteren Culturen dieses Mal gebrauchen, als es früher der Fall gewesen war. Diese Experimente stellen gewiss nicht das Optimum dar, welches bei solchen Versuchen zu erwarten ist; die Resultate wären vielleicht auch besser ausgefallen, wenn man die Immunisirung höher getrieben hätte.

Die schützende Kraft von diesem letzten Immunserum soll man aber auch nicht zu gering schätzen; es ist uns in der That gelungen, mit einer ziemlich grossen Menge von Serum gegen die gleichzeitige Einspritzung von einer 50 fach tödtlichen Dosis zu schützen; wenn wir eine 100 fach tödtliche Dosis erreichten, da konnten wir nur eine Verzögerung des Todes bemerken; bei diesen Thieren war der culturelle Sectionsbefund negativ.

Nicht sehr gute Resultate wurden bei der abgesonderten Einspritzung von Serum und Cultur erzielt. Wenn nämlich das Serum subcutan eingespritzt wurde, starben fast alle Thiere nach der intraperitonealen Injection von Influenza; der Tod trat auch hier in der Regel mit einer Verzögerung von 3 bis 4 Tagen ein. Dieses Serum wurde von mir in dunklem und in einem kühlen Orte aufbewahrt; es verlor aber schon nach einigen Tagen seine schützende Kraft fast vollständig.

Wirkung der Galle von den Influenza-Thieren.

Nach der genialen Entdeckung von R. Koch über die schützende Wirkung der Galle von an Rinderpest eingegangenen Thieren ging man daran, auch bei anderen Infectiouskrankheiten die schützende Wirkung der Galle nach dieser Richtung zu untersuchen. Die Studien über dieses Thema sind aber nicht so weit vorgeschritten, denn es fehlen noch jetzt die Angaben über das Verhalten der Galle bei vielen bekannten Infectionen. Nur bei Lissavirus giebt es ziemlich umfangreiche Veröffentlichungen;

Frantzius¹ glaubte nämlich gefunden zu haben, dass sich in der Galle eines an Lissa gestorbenen Thieres, ähnlich wie bei Rinderpest, Schutzstoffe bildeten, die andere Thiere zu retten im Stande waren. Die Annahme von Frantzius wurde aber von den Versuchen von anderen Autoren (Vallée², Kraus³) als unrichtig erklärt, denn auch normale Galle war im Stande, auf das Lyssavirus eine zerstörende Wirkung auszuüben. In der vor Kurzem erschienenen Arbeit von Neufeld⁴ wird auch auf eine bakteriolytische Wirkung von normaler Galle auf Pneumokokken hingewiesen. Ich will es hier auch nicht unterlassen, eine Arbeit von Vincenz⁵ zu erwähnen, der die antitoxische Wirkung der Galle von tetanisirten Thieren mit ziemlich günstigen Resultaten studirte.

Bei der Gelegenheit von meinen bakteriologischen Studien über Influenza lag es nahe, auch das Verhalten der Galle gegenüber der Influenzainfection nachzuforschen. Und da die Resultate, die ich mit der Galle von den an Influenza eingegangenen Thieren anstellte, wenn nicht positiv, jedoch in ziemlich befriedigender Weise ausfielen, so glaubte ich, dass es nicht ohne Interesse sein würde, auch die schützende Wirkung der Galle von den immunisirten Thieren etwas genauer zu studiren.

Um sichere Schlüsse aus diesen Experimenten ziehen zu können, war es angezeigt, sich früher über die eventuelle baktericide Eigenschaft der normalen Galle zu orientiren. Ich prüfte daher, ob man durch Zusatz von Galle einem für Influenza passenden Nährboden das Wachsthum der Influenzabacillen auf demselben verhindern konnte. Diese Experimente, über welche ich bei anderer Gelegenheit berichtet habe, fielen alle negativ aus, denn nicht nur der Zusatz von Galle war nicht im Stande, die Influenzabacillen in ihrem Wachsthum auf Blutagar zu verhindern, sondern es gelang mir sehr gut, durch Zusatz von stark mucinhaltiger Menschen-galle auf dem einfachen Agar ein ziemlich üppiges Wachsthum der Influenzabacillen zu bewirken. Dass dieser Nährboden aber nicht sehr passend für die Influenzabacillen war, konnte ich aus den zahlreichen Involutionsformen, die ich bei den Influenzabacillen bemerken konnte, schliessen.

Es blieb mir nun übrig, die Wirkung von normaler Galle gegenüber den Influenzabacillen im Thierorganismus selbst zu studiren; einerseits untersuchte ich, ob durch die Gegenwart von Galle durch längere Zeit die Influenzabacillen ihre Virulenz einbüßen, oder nicht; andererseits studirte ich bei anderen Versuchen das Verhalten der Thiere bei einer gleichzeitigen Einspritzung in die Bauchhöhle von Galle und Influenzabacillen.

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. 1898. Bd. XXIII.

² *Annales de l'Institut Pasteur*. 1899.

³ *Diese Zeitschrift*. Bd. XXXIV. ⁴ *Ebenda*.

⁵ *Deutsche med. Wochenschrift*. 1898. Nr. 34.

Was die ersteren Versuche anbetrifft, wurde von mir einer Aufschwemmung von Influenzabacillen in physiologischer Kochsalzlösung etwas Galle zugesetzt und 2 bis 24 Stunden im Brutschranke bei einer Temperatur von 37° gehalten. Bei dem Zusatze der Galle zu diesen so hergestellten Emulsionen bemerkte ich fast immer eine leichte Aufklärung der opalescirenden Flüssigkeit, so dass ich Anfangs an eine bakteriolytische Eigenschaft Seitens der normalen Galle glaubte, derjenigen ähnlich, die von Neufeld letzts bei Diplokokken beschrieben wurde. Die mikroskopische Untersuchung von diesen Flüssigkeiten liess aber immer sehr zahlreiche Influenzabacillen bemerken, die durch den Zusatz von Galle etwas kleiner und kürzer, so wie kleine Diplokokken aussahen. Die Widerimpfung auf Blutagar von diesen Emulsionen von Influenza war immer eine positive, ja auch nach 24stündigem Wirkenlassen der Galle.

Was die Verimpfungen an Thiere anbelangt, verloren die Influenzabacillen-Emulsionen in Gegenwart von Galle ihre Virulenz nicht in höherem Grade als die ohne Zusatz von Galle bereiteten Controlemulsionen von Influenzabacillen, die dieselbe Zeit im Brutschrank gehalten wurden. Um ein schnelles Ueberblicken auf die letztgenannten Experimente zu gestatten, so erlaube ich mir einige Beispiele davon in der Tab. XXIII kurz zusammenzufassen.

Tabelle XXIII.

Beispiel für die Wirkung von normaler Galle, die mit Influenzabacillen längere Zeit hindurch vermischt wird.

Nr.	Thier	Gewicht in grm	Intraperitoneale Dosis von Influenzabacillen und Galle	Verlauf	Sectionsbefund
1587	Meerschw.	210	10 Oesen von Influenzabacillen 2 Stunden bei 37° mit 1 ^{ccm} Galle eines normalen Meerschw. in 5 ^{ccm} physiolog. Kochsalzlösg. gehalten.	† 20 Std.	Aus Per. und aus Blut reine Culturen von I.B.
1588	„	190	5 Oesen von I.B. 1 ¹ / ₄ Std. bei 37° mit 0.5 ^{ccm} Galle eines normalen Kan. in 5 ^{ccm} physiolog. Kochsalzlösung gehalten.	† 20 Std.	Im Per. zahlr. I.B.; aus dem Blute sterile Culturen.
1616	„	200	3 Oesen I.B., die 24 Std. bei 37° mit 0.5 ^{ccm} Ochsen-galle, in 5 ^{ccm} physiolog. Kochsalzlösung gehalten.	† 24 Std.	Desgl.
1617	„	200	3 Oesen von I.B. ohne Zusatz von Galle 24 Std. bei 37° in 5 ^{ccm} phys. Kochsalzlösung gehalten.	† 20 Std.	Desgl.
1572	„	190	¹ / ₂ Oese v. einer 20std. I.B.-Cultur.	† 20 Std.	Desgl.
1583	„	160	¹ / ₁₀ „ „ „ 20std. „ „	Lebt	

Auch die gleichzeitige Einspritzung ins Peritoneum von Influenzabacillen und normaler Galle vermag die dadurch hervorgebrachte peritoneale Infection nicht im Mindesten zu verhindern. Höhere Dosen von Galle sind im Gegentheil selbst und für sich wegen der toxischen und irritativen Wirkung, die sie entfalten, tödtlich. Von den verschiedenen normalen Gallen werden Meerschweinchen- und Kaninchengallen von Meerschweinchen in der Dosis von 1^{ccm} sehr gut vertragen. Die intraperitoneale oder subcutane Einspritzung von normaler Ochsen- und Hundegalle vermag im Gegentheil sehr oft den Tod auch in der Dosis von 1^{ccm} mit stark irritativen Erscheinungen bei Meerschweinchen hervorzubringen.

Tabelle XXIV.

Beispiel für die Wirkung von einer gleichzeitigen Einspritzung von Influenzabacillen und normaler Galle.

Nr.	Thier	Gewicht in grm	B e h a n d l u n g	Verlauf	Sectionsbefund
754	Meerschw.	190	6 Oesen von I.B. mit 0.5 ^{ccm} normaler Meerschw.-Galle intraper. gleichzeitig eingespritzt	† 20 Std.	Reine Culturen von I.B.
755	„	200	3 Oesen von I.B. mit 0.25 ^{ccm} normaler Meerschw.-Galle gleichz.	† 20 Std.	desgl.
1289	„	280	5 Oesen I.B. mit 1 ^{ccm} normaler Galle eines Hundes gleichz. Minimal tödtliche Dosis der Influenza-cultur = 1 Oese	† 20 Std.	desgl.
1861	„	250	1/2 Oese I.B., 1/2 ^{ccm} normal. Hundegalle gleichz. (Minimal tödtliche Dosis der I.B. = 1/10 Oese)	† 20 Std.	Reine Culturen von I.B. aus Per. u. aus Blut.
1859	„	250	1/2 ^{ccm} normaler Hundegalle intraperitoneal	† 20 Std.	Hämorrhagisch. Exsudat, stark hyperämische Organe, Cult. steril
1684	„	420	5 ^{ccm} norm. Ochsen-galle intraper.	† 6 Std.	
1683	„	400	1 ^{ccm} „ „ „	† 48 Std.	desgl.

Die erste Frage, die wir uns stellen sollen, betrifft nun das Verhalten von Galle, welche aus Thieren stammt, die an der künstlichen Influenza-infection zu Grunde gegangen sind. Bei diesen Experimenten ist es mir nur selten hie und da gelungen, die Thiere mittels gleichzeitiger Einspritzung von Galle und Influenzabacillen vor dem Tode zu schützen; sehr oft gingen die Thiere nach 24 bis 48 Stunden zu Grunde, ohne dass man bei der Autopsie derselben die üblichen Zeichen der acut verlaufenen Influenzaperitonitis bemerken konnte.

Bevor ich aber diese Experimente hier kurz zusammenfasse, ist es nicht ohne Interesse, einige Worte über die Eigenschaften der Galle selbst von den an Influenza eingegangenen Thieren zu spenden. Bei zahlreichen systematischen Untersuchungen ist es mir nie gelungen, in der Galle von den an Influenza gestorbenen Thieren die Influenzabacillen nachzuweisen, und doch war oft die Leber voll von Influenzastäbchen.

Die Galle von den an Influenza gestorbenen Meerschweinchen kann man nicht als normale Galle betrachten; die mannigfaltigen Veränderungen, die man in der Leber von diesen Thieren beobachten kann, sind nicht ohne Einfluss auf die Absonderung der Galle; oft, wenn die Leber stark angegriffen scheint, und in Entartung gerieth, hat die Absonderung der Galle ganz aufgehört, und wenn man auch einige Tropfen davon gewinnen kann, hat diese Flüssigkeit ganz und gar ihr physiologisches Aussehen verloren, sie wird hämorrhagisch, trübe. Bei den Thieren, die nicht zu hohe Mengen von Influenzabazillen bekommen haben, ist die Absonderung der Galle durch die manifeste Hyperactivität der Leber, die sich stark hyperämisiert, eher vermehrt; sie nimmt aber eine röthliche Farbe an, ist bei einigen Thieren (Kaninchen, Hunden) sehr reich an Mucin, durch Sieden und Acidificirung bekommt man ziemlich starke Mengen von Albumin. Mikroskopisch werden zahlreiche zusammengruppirte Leberzellen, Leukocyten und rothe Blutkörperchen aufgefunden.

Diese Veränderungen, die ich hier kurz skizzirt habe, sind nicht bei allen Thieren gleich und stehen oft mit der Virulenz und mit der Menge der eingespritzten Influenzabacillen in strictem Zusammenhange. Wenn man daher die Resultate, die man mit verschiedenen Proben von Galle erhalten hat, richtig schätzen will, so muss man die Veränderungen, die in der Leber auftreten, nicht ausser Acht lassen.

Bei den Experimenten, die ich mit der Galle von an Influenza eingegangenen Thieren anstellte, gelang es mir, wie gesagt, hie und da auch einige Thiere zu retten; oft fand ich bei den Autopsieen von den Thieren, die so behandelt wurden, vielmehr die Zeichen einer Intoxication, als diejenigen einer acuten Infection; öfters bemerkte man bei diesen Thieren nur ein ganz geringes Exsudat, ohne Eiterflocken, die Organe waren stark hyperämisiert, man bemerkte aber auf denselben den fibrinösen Ueberzug gar nicht, den man bei fast allen an Influenza eingegangenen Thieren findet. Die Culturversuche aus der Bauchhöhle und aus dem Blute fielen oft negativ aus.

In der folgenden Tabelle (Tab. XXV) werden die Resultate von diesen Versuchen kurz zusammengefasst. Die Einspritzung von Galle und Influenzabacillen wurde fast immer am selben Orte durchgeführt; die Galle wurde vor der Einspritzung unmittelbar mit den Influenzabacillen vermischt, nur

ausnahmsweise wurde die Vermischung einige Stunden früher ausgeführt, um durch das längere Einwirken der Galle etwas bessere Resultate gewinnen zu können. Die Galle wurde in möglichst steriler Weise aus der Gallenblase der gestorbenen Thiere gewonnen und wurde immer vor dem Gebrauche auf ihre Sterilität culturell geprüft. Bei den Experimenten, die in der nächsten Tabelle vorgeführt werden, wurde immer die Galle von Thieren gebraucht, die 20 bis 24 Stunden nach der Einspritzung von 1 bis 2 Culturen von Influenza (minimal tödtliche Dosis $\frac{1}{4}$ Cultur) zu Grunde gegangen waren.

Tabelle XXV.

Beispiel für die schützende Kraft von Galle, die aus Thieren stammt, die an acuter Influenza eingegangen sind.

Thier, aus welchem die Galle stammt					
Nr.	Thier	Gewicht in grm	Intraperitoneale Dosis der I.B.	Verlauf	Section
612	Meerschw.	250	1 Cultur	† 24 Std.	Reine Culturen
611	"	260	2 Culturen	† 20 "	" "
620	"	280	1 Cultur	† 20 "	" "
622	"	330	1 "	† 4 Tagen	Culturen steril
617	"	250	1 "	† 24 Std.	Reine Culturen
605	"	288	1 "	† 24 "	" "
623	"	300	1 "	† 20 "	" "

Thier, bei welchem die schützende Kraft der Galle versucht wird						
Nr.	Thier	Gewicht in grm.	Intraper. Dosis der I.B.	Intraper. Dosis der Galle in cem	Verlauf	Section
614	Meerschw.	310	1 Cultur	0.5	lebt	
613	"	340	1 "	1	† 48 Std.	Culturen steril
632	"	330	1 "	1	† 4 Tagen	" "
607	"	400	1 "	0.5	† 20 Std.	Culturen positiv
619	"	345	1 "	1	† 20 "	Culturen meistens ohne I.B.
606	"	270	1 "	1	† 20 "	Zahlreiche I.B.
628	"	450	1 "	1	† 24 "	desgl.

Minimal tödtliche Dosis $\frac{1}{4}$ Agarcultur.

Will man nun die Resultate schätzen, die in der vorstehenden Tabelle zusammengefasst sind, so muss man sich die Unterschiede, die in der Wirkung von den verschiedenen Galleproben zu Tage traten, mit den verschiedenen Graden von Veränderungen, die man in der Galle der eingegangenen Thiere beobachtete, erklären. Selbstverständlich kann man

die schützende Kraft der Galle, die aus den Influenzathieren stammt, längst nicht mit derjenigen, die in der Rinderpestgalle in so brillanter Weise hervortritt, vergleichen; wir können es aber nicht ausschliessen, dass manchmal auch die Galle von den an Influenza eingegangenen Thieren eine wenn auch sehr geringe Schutzwirkung entfalten kann. Um etwas bessere Resultate gewinnen zu können, war es nun angezeigt, so viel als möglich die Galle zu einer Zeit aus den Thieren zu gewinnen, wo die Veränderungen der Leber und folglich der abgesonderten Galle noch nicht für die Activität dieses Organs so tiefgreifend geworden waren; um dieses Ziel zu erreichen, war es nun erforderlich, die Galle entweder vor dem Tode der Thiere zu gewinnen, oder nur die Galle von jenen Thieren zu gebrauchen, die die Infection überstanden hatten. Einerseits verlief aber die Infection bei den Meerschweinchen so rasch, dass man kaum die Zeit hatte, die erste Bedingung zu erreichen, andererseits, wenn man den Thieren zu kleine Dosen von Influenza einspritzte, entgingen sie zwar dem Tode, die aus ihnen ausgepresste Galle besass aber keine schützende Wirkung. Aus allem dem eben Gesagten erhellte die Nothwendigkeit, die Galle von den Thieren zu gebrauchen, die wegen einer vorherigen Immunisirung eine mehrfach tödtliche Influenzadosis überstanden hatten.

Wirkung der Galle von immunisirten Thieren.

Wie es zu erwarten war, fielen die Experimente, die ich mit der Galle von immunisirten Thieren anstellte, weit besser aus; ich konnte in der That nicht nur eine schützende Wirkung bei letzterer erkennen, sondern auch eine der specifischen Eigenschaften, die im Serum von den immunisirten Thieren so schön zu Tage tritt, bemerken. Diese Galleproben besaßen in der That eine ziemlich ausgeprägte Agglutinationsfähigkeit, die aber nicht den hohen Grad, den ich bei dem Serum derselben Thiere bemerken konnte, erreichte.

Ueber das Agglutinationsvermögen Seitens der Galle wurden, so viel ich weiss, von keinem Autor methodische Untersuchungen angestellt. Bei der Durchmusterung der Litteratur finde ich nur von Widal und Sicard¹ eine Erwähnung der agglutinirenden Fähigkeit bei einer Galleprobe, die aus einer typhösen Leiche stammte; bei einem zweiten Falle wirkte die Galle gar nicht agglutinirend. Ebenfalls in einer comparativen Untersuchung bei drei Fällen, die an Typhus gestorben waren, bemerkte Courmont², dass die Agglutination bei der Galle von Typhusleichen

¹ *Presse médicale*. 1896. Nr. 80.

² *Société de biologie*. 30. II. 1897.

nur selten und nicht in so hohem Grade, wie bei dem Serum eintritt. Auch Arloing¹, der die thierischen Flüssigkeiten von den an Peripneumonie eingegangenen Thieren studirte, konnte bei der Galle eine, wenn nicht hochwerthige Agglutinationsfähigkeit bemerken.

Wie aus diesem kurzen Referate hervorgeht, fehlen in der Litteratur Angaben über die Agglutinationsfähigkeit der Galle bei immunisirten Thieren vollständig. Es war daher von grossem Interesse für mich, auch über dieses Thema einige Untersuchungen anzustellen. Bevor ich aber die Resultate von meinen Versuchen darlege, ist es angezeigt, über das Verhalten der Galle von normalen Thieren und von Thieren, die an Influenza eingegangen sind, kurz zu berichten.

Normale Galle von Meerschweinchen und Kaninchen besitzt, wie aus zahlreichen von mir angestellten Versuchen hervorgeht, keine agglutinirende Wirkung auf Influenzabacillen. Nur bei normaler Hundegalle kann man eine schwache Agglutination bemerken. Da Hundegalle sehr oft reich an Mucin ist, so soll man wahrscheinlich dieser letzteren Substanz die Agglutinationsfähigkeit zuschreiben.

Die Galle von den an Influenza eingegangenen Thieren besitzt ebenfalls keine Agglutinationsfähigkeit; bei den zahlreichen Untersuchungen, die ich zu diesem Zwecke angestellt habe, konnte ich niemals eine wenn gleich minimale Wirkung Seitens der Galle feststellen. Ich unterlasse es daher, diese Versuche mitzuthellen; die mit der Galle von den immunisirten Thieren angestellten Untersuchungen werden in Tab. XXVI vorgeführt.

Dass die Galle von den vorbehandelten Thieren manchmal, obwohl in nicht grossen Dilutionen, agglutinirend wirkt, kann man aus den vorgeführten Experimenten mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen.

Da über dieses Thema nähere Angaben von anderen Autoren ganz fehlen, so habe ich es auch unternommen, dem Agglutinationsvermögen der Galle im Vergleiche mit dem Serum bei demselben Thiere nachzuforschen; aus diesen Experimenten, die ich auch mit anderen Bakterien unternommen habe, ergibt sich, dass die Agglutinationsfähigkeit bei der Galle viel später eintritt, als bei dem Serum; bei Thieren nämlich, die ein schwach agglutinirendes Serum besitzen, kann man in der Galle keine Agglutination wahrnehmen; dieselbe tritt nur dann in der letztgenannten Flüssigkeit auf, wenn das Serum schon eine ziemlich hochwerthige Agglutinationsfähigkeit erreicht hat, d. h. nach einer längeren Vorbehandlung. Aus der Tab. XXVI wird übrigens in klarer Weise diese Thatsache bewiesen; bei Thieren nämlich, die mit einer kleinen Menge von Influenza vorbehandelt waren, war die Galle nur sehr schwach agglutinirend; nur nach

¹ *Société de biologie.* 30. I. 1897.

Tabelle XXVI.

Beispiel für die agglutinirende Reaction von verschiedenen Galleproben, die aus Thieren stammen, die gegen Influenza immunisirt worden sind.

Thiere, die die Galle geliefert haben			Agglutinationsversuch				
Nr.	Thier	Vorbehandlung	Proportion	Nach 20 Min.	Nach 2 Std.	Nach 4 Std.	Nach 24 Std.
762	Kan.	Vorbeh. mit einer einzigen Einspr. von drei ster. I.B.-Culturen, wird 2 Tage später getödtet	1: 10	0	0	0	0
			1: 20	0	0	0	0
763	Meerschw.	Vorbeh. mit einer einzigen Einspr. von drei ster. I.B.-Culturen, wird 3 Tage später getödtet	1: 10	0	+	++	++
			1: 20	0	0	+	++
1268	Hund	Vorbeh. mit einer Einspr. von 50 leb. I.B.-Culturen intraper., wird 3 Tage später getödtet	1: 10	+	++	+++	++++
			1: 25	+	++	+++	++++
			1: 50	0	0	0	0
1280	Meerschw.	Vorbeh. mit 10 I.B.-Culturen, wird 3 Tage später getödtet	1: 10	+	++	+++	++++
			1: 20	+	++	+++	++++
			1: 40	0	+	++	+++
			1:100	0	0	0	0
759	Kan.	Vorbeh. mit 25 ster. I.B.-Culturen, letzte Injection 7 Culturen, wird 7 Tage später getödtet	1: 20	0	++	+++	++++
			1: 50	0	+	+	++
600	Meerschw.	Vorbeh. mit 75 ster. I.B.-Culturen, letzte Einspr. 30 ster. I.B.-Culturen, wird 7 Tage später getödtet	1: 20	+++	++++	++++	++++
			1: 50	++	+++	+++	++++
			1:100	0	+	+	++
1090	Hund	Vorbeh. mit 229 ster. I.B.-Culturen, letzte Injection 70 Culturen, wird 21 Tage später getödtet	1: 10	+	+++	+++	++++
			1: 20	+	+++	+++	++++
			1: 50	+	++	+++	++++
			1:100	0	0	0	0
	Hund	Unbehandelter Hund	1: 10	0	+	++	+++
			1: 20	0	0	+	++
			1: 50	0	0	0	0

Optimum = ++++; Flöckchenbildung = + bis +++.

einer längeren Vorbehandlung konnte man eine höhere Agglutination bemerken, die aber nicht sehr beträchtlich war, denn bei Kaninchen und Meerschweinchen wurde nie die Proportion von 1:50 bis 1:100 überschritten. Nur bei Hunden konnte man höhere Werthe erreichen; bei diesen Thieren aber besitzt öfters, wie gesagt, auch normale Galle ein schwaches Agglutinationsvermögen.

Tabelle XXVII.

Beispiel für die schützende Wirkung der Galle, die von immunisirten Thieren stammt.

Thier, aus welchem die Galle stammt			Meerschweinchen, denen die Galle injectirt wird							
Nummer	Thier	Gewicht	Vorbehandlung	Nummer	Thier	Gewicht in g	Intrapert. Dosis der I.B.	Dosis der Galle	Verlauf	Section
618	Meerschw.	1100	Vorbehandelt mit Influenzabacillen-Gehirnmaulion; letzte Einspritzung eine Influenzabacillencultur; Extraction der Galle	629	Meerschw.	420	3 Oesen	1 cem	lebt	Reincultur
				630	"	500	1 Oese	Controlle	+ 20 Std.	
631	"	420	Welches eine gleichzeitige Einspritzung von 8 Oesen Influenzabacillen und 1 cem Immungalle überstanden hat, wird vier Tage später getödtet	636	"	310	5 Oesen	1 cem	lebt	
				633	"	310	1 Oese	Controlle	+ 20 Std.	"
551	"		Vorbehandelt mit 181 Influenzabacillenculturen; letzte Injection 13 Culturen; wird nach 6 Tagen getödtet	753	"	220	6 Oesen	1/2 cem	lebt	"
				749	"	220	1 Oese	Controlle	+ 20 Std.	
637	"		Vorbehandelt mit 15 sterilisirt. Influenzabacillenculturen; letzte intrap. Injection 5 Culturen; stirbt nach 48 Stunden	691	"	480	3 Oesen	1/2 cem	lebt	"
				692	"	470	1 Oese	Controlle	+ 20 Std.	
1090	Hund	10·0	Vorbehandelt mit 230 Influenzabacillenculturen; letzte intrapert. Einspritzung 70 Culturen; getödtet nach 21 Tagen	1263	"	260	30 Oesen	1 cem	lebt	"
				1264	"	260	15 "	1 "	"	
1268	"	10·5	Vorbehandelt mit einer einzigen Einspritzung von 50 Influenzabacillenculturen, wird 4 Tage später getödtet.	1286	"	200	1 Oese	Controlle	+ 20 Std.	"
				1279	"	200	30 Oesen	1 cem	"	"
				1280	"	200	30 "	1 "	lebt	"
				1286	"	203	1 Oese	Controlle	+ 20 Std.	"

Ueber die schützende Wirkung von der Galle, die aus immunisirten Thieren stammt, wird in der Tab. XXVII kurz berichtet.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, überstanden die gleichzeitig mit Immungalle eingespritzten Meerschweinchen bis zu einer 30 fach tödtlichen Dosis; höhere Dosen von Influenza wurden von mir nicht versucht, wir wissen daher nicht, wie sich die Thiere nach einer stärkeren Influenzaeinspritzung verhalten. Die Thiere, deren Vorbehandlung eine zu geringe gewesen war, lieferten eine längst nicht so wirksame Galle, wie diejenigen Meerschweinchen, die durch längere Zeit und mit höheren Dosen von Influenza behandelt wurden.

Aus diesen Experimenten gewinnt man aber den Eindruck, als ob die schützende Wirkung der Galle nicht mit der Serumwirkung gleichen Schritt geht, denn bei einigen Thieren besass das Serum (Meerschweinchen 551, 637) gar keine oder eine sehr geringe immunisirende Eigenschaft, während die Galle eine active Wirkung zeigte. Man kann daher bei diesen Versuchen nicht von einer Anhäufung von Antikörpern im Blute, die theilweise in die Galle übergegangen sind, sprechen, denn sonst hätte das Serum von denselben Thieren eine viel höhere schützende Kraft entfalten sollen, während bei meinen Versuchen gerade das Gegentheilige geschah. Bei einigen Experimentenreihen trat ja oft in eclatanter Weise dieser Unterschied hervor, denn während manchmal alle die mit Immunserum behandelten Thiere zu Grunde gingen, wurden nur diejenigen Thiere gerettet, die mit Immungalle behandelt worden waren.

Und dass es auch so sein kann, dürfen wir uns nicht wundern, nachdem R. Koch in so glänzender Weise die Selbstständigkeit der Function der Galle bei Rinderpest bewiesen hat. Das Serum nämlich von den an Rinderpest eingegangenen Thieren zeigte, wie bekannt, gar keine schützende Eigenschaft, während die Galle von denselben Thieren in so brillanter Weise vor der sicher tödtlichen Infection schützte.

Bei den anderen Infectionen scheinen die Sachen nicht so einfach zu stehen, denn es wurde noch von keinem Autor eine so brillante Wirkung Seitens der Galle nachgewiesen; dass aber die Leber auch bei den anderen Infectionen eine grosse Rolle bei der Bekämpfung der Krankheit spielt, ist ohne Zweifel; wir haben eine Andeutung davon in unseren Experimenten über Influenza; auch mit anderen Bakterien ist es mir hie und da gelungen, mittels Einspritzung von Galle, welche von Thieren stammte, die einer Infection erlegen waren, gegen dieselbe Infection andere Thiere zu retten; auch ein Beispiel davon wird in der Arbeit von Neufeld über die bakteriolytische Wirkung von normaler Galle auf Diplokokken (Seite 464) gegeben.

Aus den Versuchen, die wir mit der Galle von an Influenza gestorbenen Thieren und mit der Galle von immunisirten Thieren angestellt haben, können wir indessen keine allgemeinen Schlussfolgerungen ziehen; die Zahl der angestellten Experimente ist eine zu geringe, die Versuche selbst sind auf eine einzige Infection beschränkt, es fehlen andererseits, so viel ich weiss, die Angaben von anderen Autoren über dieses so interessante Thema vollständig. Um dieser Frage etwas näher zu treten, habe ich weitere Experimente mit grösseren Thieren und auch mit anderen Bakterien angestellt, bei welchen die Immunisirungsvorgänge etwas besser bekannt sind. Ueber die Resultate von diesen letzten Versuchen, die noch nicht zu Ende gebracht worden sind, hoffe ich bei einer künftigen Gelegenheit referiren zu können.

Was die Versuche anbelangt, die mit Influenza angestellt wurden, so müssen wir uns augenblicklich begnügen, folgende Thatfachen festgestellt zu haben:

I. Die Galle von den an Influenza eingegangenen Thieren besitzt nur ausnahmsweise schützende Eigenschaft gegen dieselbe Infection.

II. Die Galle von den Thieren, die gegen Influenza ziemlich hoch immunisirt wurden, entfaltete eine ziemlich constante schützende Wirkung bei der gleichzeitigen Einspritzung von vielfach tödtlichen Dosen von lebendigen Influenzabacillen, die die schützende Wirkung des Serums weit übertrifft.

III. Bei der Galle der gegen Influenza immunisirten Thiere kann man oft ein ziemlich hohes Agglutinationsvermögen beobachten, welches aber demjenigen des Serums von demselben Thiere nicht zu übertreffen im Stande ist.

Bei der Beurtheilung von allen den hier vorggeführten Experimenten, die mehrere Jahre hindurch und an einem ziemlich umfangreichen Thiermaterial ausgeführt worden sind, kann man nicht die Möglichkeit ausschliessen, auch gegen Influenza bei Thieren eine künstliche Immunisation vollbringen zu können. Die von mir vorgezogene Behandlungsweise (subcutane Vorbehandlung und intraperitoneale Immunitätsprüfung) bedeutet schon für sich selbst eine Garantie für die richtige Beurtheilung der Resultate. Da einige von den von mir behandelten Thieren eine 70- bis 100 fach tödtliche Dosis gut überstanden haben, kann man sicher nicht von einer erhöhten Resistenz Seitens der so behandelten Thiere sprechen. Und wenn auch die Immunisirung nicht eine höhere gewesen ist, so sind wir daraus gar nicht berechtigt, es ganz auszuschliessen, dass man sie in weiteren Versuchen viel höher gestalten wird.

Im Serum selbst von den immunisirten Thieren wurden übrigens spezifische bakteriolytische und agglutinirende Eigenschaften in sehr klarer Weise nachgewiesen. Wir haben bei unseren Sera auch schützende Eigenschaften beobachtet, die, wenn nicht sehr glänzend, uns doch augenblicklich befriedigen können. Die niedrigen therapeutischen Werthe, die wir bei unseren Sera erzielt haben, bedeuten auch nichts Besonderes gegen unsere Auffassungen. Wie ich schon im Anfange dieser Arbeit betont habe, kann man aus dem negativen Ausfalle selbst der serotherapeutischen Versuche die Möglichkeit einer künstlichen Immunisirung gar nicht leugnen; wenn man die so brillant gelungenen serotherapeutischen Versuche bei Diphtherie mit denjenigen vergleicht, die bei anderen Infectionen erzielt wurden, bei welchen die Immunisirung in sicherer Weise gelungen war, so schreitet man von der höchst activen Wirkung des antidiphtheritischen Serums immer mehr nach unten, um bis zu ganz indifferenten Sera zu gelangen; und doch wird die Möglichkeit einer Immunisirung bei fast allen Infectionen von keinem Autor mehr geleugnet, und bei manchen auch praktisch verwerthet (Tollwuth, Typhus u. s. w.). Die Erreichung eines activen Serums ist daher eine viel complicirtere Frage, als diejenige der activen Immunisirung und geht nicht immer gleichen Schrittes mit letzterer.

Ich will es hier nicht unterlassen, auf die positiven Resultate hinzuweisen, die ich bei den Experimenten erzielt habe, die mit Galle von immunisirten Thieren angestellt wurden. Die schützende Wirkung der Galle der Thiere, die eine ziemlich starke Vorbehandlung überstanden hatten, könnte vielleicht einen weiteren Beweis für die von uns erzielte Immunisirung gegen Influenza darstellen.

Einige Autoren stützen sich, um die Möglichkeit der künstlichen Immunisirung gegen Influenza leugnen zu können, auf die Thatsache, dass man bei den natürlichen Vorgängen keine Immunität bei den an Influenza erkrankten Individuen beobachtet. Vor Allem aber muss ich bemerken, dass es noch nicht bewiesen ist, dass bei den an Influenza erkrankten Individuen keine, wenn auch minimale und auch vielleicht schnell vorübergehende Immunität hervortritt. Wie können wir es denn uns anders erklären, dass eine Infection in Heilung übergeht, wenn wir nicht eine, wenn auch geringe Immunität des Organismus annehmen wollen? Wird vielleicht nicht von allen Autoren in letzter Zeit die Immunität, die nach der Heilung einer Infection eintritt, fast immer als eine nach kürzerer oder längerer Zeit vorübergehende betrachtet? Wie kann man denn auch anders die Abschwächung, die in dieser letzten Zeit bei der Virulenz von vielen Influenzaepidemien eingetreten ist, erklären?

Wassermann¹, der sich mit dieser Frage beschäftigte, glaubt hierfür eine von früheren Epidemien zurückgebliebene Immunität als Ursache annehmen zu dürfen; er betont auch, dass die Influenza zweifellos eine gewisse Immunität zurücklässt, da in der gleichen Epidemie Doppelterkrankungen derselben Person selten sind. Dass die Immunität eine ziemlich vorübergehende ist, wird auch bei unseren Experimenten als sehr wahrscheinlich gehalten.

Wenn wir daher bei der Beurtheilung von unseren Experimenten die hier kurz gemachten Beobachtungen in's Auge fassen, so müssen wir mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen, dass es auch gegen Influenza möglich ist, eine künstliche Immunisirung zu erhalten.

¹ *Deutsche med. Wochenschrift.* 1900. Nr. 28.