[Aus dem pathologisch-anatomischen Institut der Universität Moskau.]

Ueber künstliche Immunität der Kaninchen gegen Milzbrand.

Experimentelle Untersuchung.

Von

Privatdocenten Dr. **N. Melnikow-Raswedenkow.**

Einleitung.

Unsere experimentelle Untersuchung betrifft nur einen eng begrenzten Theil aus dem umfangreichen Gebiet der Immunitätslehre; sie handelt nur von der künstlichen Immunität der Kaninchen gegen Milzbrand.

Die Versuche, Kaninchen gegen Milzbrand zu immunisiren, begannen vor etwa 15 Jahren gleichzeitig mit der Entdeckung der Methoden zur Bereitung abgeschwächter Culturen, welche alsbald bei der Impfung von Hausthieren gegen Milzbrand Verwendung fanden. Ein grosses Verdienst in dieser Sache gebührt Pasteur, dessen Untersuchungen das Erscheinen zahlreicher Arbeiten zur Frage von der Schutzimpfung der Thiere gegen Milzbrand mit abgeschwächten Culturen zur Folge hatten. Im weiteren Entwicklungsgange der Bakteriologie begann man andere Methoden künstlicher Immunisirung auszuarbeiten, bei welchen die Vaccinationsmittel keine lebensfähigen Bacillen enthalten. Wenn auch das Blutserum immunisirter Thiere hauptsächlich zur Immunisation gegen die Infection mit toxischen Mikroorganismen Verwendung findet, so erstreckte sich gleichwohl ein Theil dieser Versuche auch auf die infectiösen Mikroorganismen, darunter auch auf die Bacillen des Milzbrandes. Bei der Erforschung der Frage vom Antagonismus zwischen den einzelnen Arten pathogener Mikroorganismen wurde auch den Milzbrandbacillen besondere

Aufmerksamkeit geschenkt. Es wurden Versuche gemacht, die Bedingungen des Kampfes zwischen den Milzbrandbacillen und anderen Mikroorganismen klarzulegen, sowohl *in vitro*, als auch im Thierkörper. Diese Versuche dienten zur Grundlage für die Methode der Immunisirung von Kaninchen mit Culturen solcher Mikroorganismen, welche als Antagonisten der Milzbrandbacillen galten.

Wir haben nur die Haupttypen der Immunisirungsversuche von Kaninchen gegen Milzbrand angedeutet; dazwischen giebt es noch Uebergangsarten, welche sich nicht immer unter diese oder jene Kategorie bringen lassen. Die einen Methoden tragen den Charakter von Schutzimpfung der Kaninchen gegen Milzbrand, die anderen nähern sich mehr der experimentellen Behandlung von Kaninchen, welche künstlich mit Milzbrand inficirt sind.

Pasteur'sche Vaccine.

Unter der Bezeichnung „abgeschwächte“ Milzbrandbacillen versteht man Bacillen, deren Virulenz erheblich herabgesetzt ist, unabhängig von ihrer Vermehrungsfähigkeit.

Als wesentlichstes Kriterium zur Beurtheilung des Grades der Virulenz, bezw. ihrer Abschwächung, dient die Controlinfection von Thieren: Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen. Man nimmt allgemein an, dass eine virulente Cultur von Milzbrandbacillen sämtliche damit inficirten Kaninchen tödtet. Eine Cultur, welche bis zum Grade der sogenannten zweiten Vaccine abgeschwächt ist, braucht Kaninchen nicht zu tödten, tödtet aber Meerschweinchen. Bei noch erheblicherer Abschwächung bleiben auch Meerschweinchen am Leben, und nur Mäuse gehen noch zu Grunde. Endlich erreicht die Abschwächung einen solchen Grad, wobei die Bacillen, ohne ihre Lebensfähigkeit einzubüssen, auch für Mäuse unschädlich werden, überhaupt ihre Virulenz völlig eingebüsst haben, ihre Vermehrungsfähigkeit dagegen behalten.

Von den Methoden zur Herstellung abgeschwächter Culturen von Milzbrandbacillen ist zuerst die Methode der Abschwächung durch hohe Temperaturen angegeben worden.

Toussaint (64, 65) war der Erste, der diese Methode angewandt hat. Er bereitete die Vaccine aus defibrinirtem Blut, welches Milzbrandbacillen enthielt, indem er das Blut durch Papier filtrirte oder es im Laufe von 10 Minuten bei 55° C. erwärmte. Der genannte Forscher glaubte, dass die Bacillen bei dieser Temperatur zu Grunde gehen, und dass die Producte ihrer Lebensthätigkeit das immunisirende Princip der Vaccine bilden.

Pasteur, Roux und Chamberland (52), welche die Immunisirungsversuche an Schafen nach der Toussaint'schen Methode wiederholten, fanden, dass dieser Methode grosse Fehler anhaften, da die Voraussetzung Toussaint's, die Erhitzung des Blutes auf 55° C. im Laufe von 10 Minuten tödte alle Bacillen, sich als irrthümlich erwies. Die Versuche der genannten Autoren zeigten, dass bei solcher Erhitzung drei Möglichkeiten vorliegen: erstens, die Bacillen gehen zu Grunde, und dann ist die Vaccine unwirksam; zweitens, die Bacillen gehen nicht zu Grunde, behalten ihre Virulenz und tödten die Schafe, und drittens, die Bacillen verändern sich unter dem Einfluss der Wärme derartig, dass sie lebensfähig bleiben, aber eine Abschwächung ihrer Virulenz erleiden; nur in letzterem Falle können die Bacillen zur Vaccination von Schafen dienen.

Somit sind die Versuche Toussaint's heutzutage nur noch von historischem Interesse; das Verdienst des Autors bleibt gleichwohl ungeschmälert, denn er hat als Erster auf die Möglichkeit der Immunisirung von Thieren gegen Milzbrand hingewiesen und Versuche angestellt, in denen die Principien der Impfungsmethoden des Milzbrandes mit abgeschwächten Culturen und Thierblut, bezw. Blutserum enthalten waren.

Pasteur (52, 53, 54) hat die Methode der Schutzimpfung von Thieren gegen Milzbrand durch abgeschwächte Culturen ausgearbeitet. Das Wesen der Pasteur'schen Methode zur Abschwächung der Virulenz besteht darin, dass die Bouillonculturen der Bacillen für längere Zeit dem Einflusse einer beständigen Temperatur von 42 bis 43° C. ausgesetzt werden. Unter solchen Bedingungen verlieren die Bacillen allmählich ihre Virulenz, so dass nach 24 Tagen etwa eine Cultur vom Charakter der sog. ersten Vaccine (*premier vaccin*) resultirt, welche Mäuse tödtet, Meerschweinchen aber nicht. Eine Cultur, welche ca. 12 Tage im Thermostat gestanden hat, die sog. zweite Vaccine (*deuxième vaccin*) ist stärker als die erste Vaccine, sie tödtet Meerschweinchen.

Die Pasteur'schen Vaccine werden zur Schutzimpfung von Hausthieren, und besonders von Schafen gegen Milzbrand gebraucht. Die Impfung der letztgenannten Thiere gegen Milzbrand besteht darin, dass den Schafen einige Zehntel eines Cubikcentimeters der ersten Vaccine unter die Haut gebracht wird, und nach ein oder zwei Wochen eine ebenso geringe Dosis der zweiten Vaccine. Nach der Vaccination treten bei den Schafen reactive Erscheinungen auf, die Temperatur steigt, die Thiere erkranken an einer leichten Form von Milzbrand, von der sie bald genesen. Die vaccinirten Schafe werden unempfindlich gegen künstliche (Probe-)Infection mit Milzbrand. Pasteur hat das Princip der Methode angegeben, andere Forscher haben sie weiter verarbeitet. Wie zu erwarten stand, erschienen bald Modificationen der Pasteur'schen Methode.

Chauveau (18) hat folgende Aenderung vorgeschlagen. Er liess auf die Bacillen höhere Temperaturen einwirken, und erzielte eine Abschwächung ihrer Virulenz in kürzerer Zeit. Chauveau liess die Bouillonculturen der Milzbrandbacillen 20 Stunden lang bei 42 bis 43° C. stehen, und exponirte sie dann einer höheren Temperatur von 47° C. im Laufe von einer, zwei oder drei Stunden, je nachdem, welchen Grad von Abschwächung er zu erzielen wünschte. Es ergab sich, dass nach dreistündiger Erwärmung auf 47° C. die Virulenz der Bacillen so weit herabgesetzt war, dass die Cultur nicht mehr im Stande war, Meerschweinchen zu tödten.

Smirnow (63), welcher die Methode Chauveau's prüfte, fand die Abschwächung der Bacillen nach dieser Methode wenig andauernd.

Wosnessenski (70) führte ein neues Princip zur Herstellung abgeschwächter Culturen ein auf Grund der Versuche von P. Bert, welcher gefunden hatte, dass comprimirter Sauerstoff, welcher bei einem Druck von 20 bis 40 Atmosphären auf die Bacillen einwirkt, dieselben rasch tödtet. Wosnessenski benutzte comprimierten Sauerstoff zur Abschwächung der Virulenz der Milzbrandbacillen. Die Versuche des genannten Autors zeigten, dass bei einem Sauerstoffdruck von 3 bis 13 Atmosphären eine Steigerung der Virulenz stattfand, wenn die Culturen sich bei einer Temperatur von 35° C. (*température engénésique*) befanden; wenn aber der Sauerstoffdruck auf 15 bis 20 Atmosphären erhöht wurde, so gingen die Bacillen sehr schnell zu Grunde. Bei einer Temperatur von 42 bis 43° C. (*température dysgénésique*) vermochten die Bacillen nur dann zu wachsen, wenn der Druck 3 bis 6 Atmosphären betrug. Versetzte man die Bacillen unter die genannten Bedingungen seitens der Temperatur und des Sauerstoffdruckes, so entwickelten sie sich langsamer, als bei 35° C., und wenn sie in eine geringe Bouillonmenge geimpft waren, so konnte man nach 4 bis 6 Tagen eine erhebliche Abschwächung der Virulenz constatiren, welche auch von den folgenden Generationen beibehalten wurde. Nahm man dagegen eine grosse Quantität der Bouillon, so erhielt man keine Abschwächung der Culturen, weil in solchem Falle der verdichtete Sauerstoff nicht zu allen Bacillen gelangen konnte.

Chauveau (19) bestätigte die Beobachtungen Wosnessenski's. Unter Benutzung seiner Methode erhielt er eine Vaccine, welche Meerschweinchen tödtete. Diese Vaccine besass die Fähigkeit, Schafen Immunität zu verleihen.

Ausser der Temperatur wirken auch chemische Agentien abschwächend auf die Virulenz der Milzbrandbacillen. Diese Methode zur Abschwächung der Culturen wurde von Roux, Chamberland und Gamaleïa ausgearbeitet.

Roux und Chamberland (12) fanden, dass in Bouillon befindliche Bacillen ihre Fähigkeit, Sporen zu bilden, einbüßten, wenn die Bouillon auf 600 bis 800 Theile einen Theil Carbonsäure enthielt. Solche Culturen waren noch nach 12 Tagen für Kaninchen giftig, nach 21 Tagen jedoch konnten sie Meerschweinchen nicht mehr tödten. Gleiche Resultate wurden mit doppeltchromsaurem Kali erzielt, welches bei einem Gehalt von 1:1000 oder 1:1700 Bouillon die Bacillen tödtet. Bei Gehalt von 1 Kal. bichromic. auf 2000 oder 5000 Bouillon bilden die Bacillen keine Sporen, bewahren aber ihre Vermehrungsfähigkeit. Culturen, welche auf die geschilderte Weise abgeschwächt sind, verlieren ihre Virulenz so schnell, dass sie nach 10 Tagen nicht mehr Schafe zu tödten vermögen. Der Grad der Abschwächung der Culturen mittels doppeltchromsaurem Kali ändert sich auch bei weiteren Ueberimpfungen nicht. Die Versuche von Chamberland und Roux (13) haben gezeigt, dass Milzbrandbacillen, welche im Laufe von 8 bis 10 Tagen dem Einfluss einer 2procent. Schwefelsäurelösung ausgesetzt gewesen sind, so weit ihre Virulenz eingebüßt haben, dass aus solchen Sporen gewonnene Culturen Kaninchen und Meerschweinchen nicht tödteten, für Schafe aber virulent blieben.

Gamaleia (34), welcher die Versuche von Chamberland und Roux bestätigt, sucht zu beweisen, dass die mit der Methode der genannten Autoren gewonnene Vaccine sich zur Schutzimpfung von Schafen gegen Milzbrand eignet.

Ausser der Temperatur und chemischen Substanzen wird die Virulenz der Bacillen auch durch das Licht abgeschwächt. Arloing (1', 2) fand, dass die Milzbrandsporen unter dem Einflusse des Sonnenlichtes sich so verändern, dass die Culturen der Bacillen, welche aus solchen Sporen zur Entwicklung kommen, bis zum Grade von Vaccine abgeschwächt erscheinen.

Wir sehen also, dass man mit Hülfe von Wärme, Licht und antiseptischen Substanzen abgeschwächte Culturen herstellen kann, deren Tauglichkeit zur Immunisation von Thieren gegen Milzbrand keine gleiche ist.

Ausser den genannten sind auch noch andere Bedingungen bekannt, unter denen die Virulenz der Milzbrandbacillen herabgesetzt wird. Electricität (66), Pyocetanin (29), Versetzung der Nährsubstanzen mit Fett (46), Kochsalz (58, S. 540), kuhwarme Milch (10), Meerwasser (57), Aufenthalt der Culturen in der Erde u. A. schwächen die Virulenz ab. Der Antagonismus zwischen den einzelnen Arten von Mikroorganismen, die zusammen wachsen, erscheint gleichfalls als abschwächendes Moment. Charrin und Guignard (17) haben in vitro

die Milzbrandbacillen abgeschwächt, indem sie daneben in denselben Nährmedien den *Bac. pyocyaneus*, Döhle (26) — den *Bac. putridus* cultivirten.

Flügge (31) hat den Versuch gemacht, die Methoden zur künstlichen Abschwächung der pathogenen Mikroorganismen zu classificiren, und alle Methoden in zwei Kategorien eingetheilt. Zu der einen Kategorie gehören die Methoden der Abschwächung der Culturen durch physikalische und chemische Agentien: Wärme, Licht, Elektrizität, Antiseptica u. s. w. Die zweite Kategorie bilden die Methoden, bei welchen die Mikroorganismen unter fremden Bedingungen cultivirt werden. So verlieren streng parasitäre Mikroorganismen ihre Virulenz auf todtm Nährsubstrat, facultative — wenn sie in einen Organismus eingeführt werden, welcher einen für ihre Entwicklung ungünstigen Boden darstellt; so büßen z. B. Milzbrandbacillen, wenn sie in den Lymphsack des Frosches eingeführt werden, ihre Virulenz ein.

Was die letztere Kategorie von Methoden zur Abschwächung pathogener Mikroorganismen nach der Flügge'schen Classification betrifft, so ist die Frage nach der Aenderung der Virulenz der Bacillen, welche man durch den Körper von Thieren hindurchpassiren lässt, die eine verschieden-gradige Empfänglichkeit für Milzbrand aufweisen, bislang noch nicht entschieden, so dass dieser Weg zur Erzielung abgeschwächter Culturen nur mit Vorsicht zu benutzen ist. Von den zahlreichen Methoden der ersteren Kategorie sind am meisten erforscht: die Pasteur'sche Methode, bei welcher die Culturen durch Wärme abgeschwächt werden, und die Methode von Roux und Chamberland, wonach zur Abschwächung der Virulenz antiseptische Mittel gebraucht werden. Die letztere Methode ergibt keine so andauernde Abschwächung, wie die erste (Heim [40]), bei welcher die ferneren Generationen der abgeschwächten Culturen den anfänglichen Grad geschwächter Virulenz beibehalten.

Somit ergibt sich aus der Litteratur der Frage von den abgeschwächten Culturen, dass die von Koch nachgeprüfte Pasteur'sche Methode für die sichere gilt.

Wir kommen nun zur Frage der Immunisation von Kaninchen gegen Milzbrand mittelst Pasteur'scher Vaccine.

Seit dem ersten Bekanntwerden der Pasteur'schen Vaccinationsmethode dienten die Kaninchen oft zur Bestimmung des Abschwächungsgrades der Culturen. Allein trotz zahlreicher Versuche gelang es nicht, Kaninchen mit abgeschwächten Culturen zu immunisiren. Bei der Vaccination dieser Thiere wurden stets negative Resultate

erzielt. Nach Impfung mit Pasteur'scher Vaccine blieben die Kaninchen am Leben, erwarben aber keine Immunität gegen Milzbrand. Dagegen erwiesen sich die Pasteur'schen Vaccine bei anderen Thieren als wirksam. Wenigstens zeigen die in Frankreich gesammelten Daten (11), dass nach Einführung der Vaccination in diesem Lande die Sterblichkeit der Thiere an Milzbrand abnahm (11). In Deutschland begegnete man der Milzbrandvaccination äusserst skeptisch, was besonders in der bekannten Polemik zwischen Pasteur und Koch (43) zum Ausdruck kam. Koch stellt die Möglichkeit, Schafe durch Impfung gegen Milzbrand unempfindlicher zu machen, nicht in Abrede, findet aber, dass die durch Vaccination erzielte Unempfindlichkeit der Schafe sich nur auf die künstliche, nicht aber auf die natürliche Infection bezieht. Die wissenschaftliche Bedeutung der Pasteur'schen Vaccine wird somit von allen Gelehrten anerkannt; was jedoch die praktische Anwendung der Vaccination betrifft, so bestehen in dieser Frage Meinungsverschiedenheiten zwischen den französischen und deutschen Forschern (25 und 3, 1891, S. 167).

So stand die Frage von der Impfung der Kaninchen mit Pasteur'scher Vaccine bis 1887. In diesem Jahre schlugen Roux und Chamberland (15) eine Methode zur Immunisation der Kaninchen gegen Milzbrand vor, welche darin besteht, dass den Kaninchen eine grosse Quantität erster Vaccine unmittelbar in's Blut injicirt wird. Das Quantum erster Vaccine, welches zur Immunisation eines Kaninchens nach Roux und Chamberland erforderlich ist, würde zur subcutanen Vaccination von 400 Schafen genügen, wenn man auf jedes Schaf 0.2^{cem} erster Vaccine rechnet. Die beschriebene Methode von Roux und Chamberland gilt als die beste Methode zur Immunisation von Kaninchen gegen Milzbrand mittels Pasteur'scher Vaccine.

Vaccine anderweitigen Ursprungs.

Im Gegensatz zu den Pasteur'schen Vaccinen enthalten die anderen Vaccine keine lebensfähigen Bacillen, welche entweder schon im Material, das zur Bereitung dieser Vaccine gedient hatte, gar nicht vorhanden gewesen, oder aber sie waren anfangs darin enthalten und auf die eine oder andere Art daraus entfernt. Die grosse Zahl derartiger Vaccine und die Mannigfaltigkeit ihrer Entstehung machen eine Classification dieser Vaccine äusserst schwierig.

Bekanntlich haben Salmon und Smith (60) zuerst auf die Möglichkeit hingewiesen, Thiere mit sterilisirten Culturen zu immunisiren (Hogcholera). Charrin (16) fand dasselbe für den *Bac. pyocyaneus*, Foà und Bonome (3, 1887, S. 409) für den *Prot. vulgaris*.

Was den Milzbrand betrifft, so hat Wyssokowitsch Schafe mit sterilisirten Pasteur'schen Vaccinen immunisirt. Maltzew (45) hat Culturen von Milzbrandbacillen durch die Chamberland'sche Kerze filtrirt, und gefunden, dass Kaninchen nach Einspritzung des Filtrats unter die Haut empfänglicher für Milzbrand werden. Klemperer (42) kochte Culturen von Milzbrandbacillen und schied daraus ein Proteïd ab, welches die Fähigkeit, Kaninchen gegen Milzbrand zu immunisiren, nicht besass. Hankin (37, 39) isolirte aus einer Cultur von Milzbrandbacillen eine Albumose, mit welcher er Mäuse gegen Milzbrand immunisiren konnte, aber die Versuche Petermann's (55) bestätigten das nicht. Es muss betont werden, dass trotz der grossen Anzahl von Arbeiten, welche der Erforschung des Milzbrandvirus gewidmet sind, letzteres doch fast völlig unbekannt ist, und auch das Wenige, was wir davon wissen, bietet nichts Zuverlässiges dar (Gamaleïa [35]).

Man kann somit sagen, dass die Versuche, Thiere mit sterilisirten oder filtrirten Culturen und Toxinen des Milzbrandes zu immunisiren, nicht von Erfolg gekrönt wurden.

Unter den verschiedenen Methoden der erörterten Gruppe ist folgende Methode der Immunisation von Kaninchen gegen Milzbrand beachtenswerth. Im Jahre 1887 — 1888 veröffentlichte der englische Gelehrte Wooldridge (69) seine Versuche über Immunisation von Kaninchen. Dieser Autor bereitete aus der Thymusdrüse von Kälbern sogenannte Thymusbouillon, inficirte dieselbe mit einer Reincultur von Milzbrandbacillen, sterilisirte sie und erhielt Vaccine. Die Versuche Wooldridge's zeigten, dass ein Kaninchen, welchem direct in's Blut 30^{cem} Thymusvaccine injicirt werden, für subcutane Infection mit Milzbrand unempfindlich wird. Die Mittheilung Wooldridge's, welche auf nur wenige Versuche gegründet war, war in Gefahr, sich unter den zahlreichen ähnlichen Mittheilungen, die alle bald in Vergessenheit geriethen, zu verlieren, zumal da der Autor selbst vorzeitig starb, ehe er Zeit gehabt hatte, seine neue Methode auszuarbeiten. Obgleich Wooldridge gar zu kühne Hypothesen über die Entstehung der Immunität aufstellte und in seinen Verallgemeinerungen entschieden zu weit ging, was bei der Prüfung eines Theiles seiner Versuche alsbald zu Tage trat (Eberth und Schimmbusch [27]), so blieb doch die Thatsache der Immunisirung von Kaninchen gegen Milzbrand mittels Thymusvaccine nicht allein unwiderlegt, sondern es wurden vielmehr die positiven Resultate Wooldridge's von Wright (71), welcher die Methode des ersteren modifizierte, im Jahre 1891 bestätigt.

Die Idee Wooldridge's, das Extract der Thymusdrüse zur Immunisation anzuwenden, benutzten Brieger, Kitasato und Wassermann (9). Genannte Autoren bereiteten Thymusvaccine zur Immunisirung gegen

Mikroorganismen der infectiösen und toxischen Gruppe, und erzielten positive Resultate bei den Vertretern der letzteren Gruppe; was aber die Milzbrandbacillen betrifft, so erwies sich die Thymusvaccine für sie als unwirksam. Es muss bemerkt werden, dass die Autoren ihre Versuche nicht so anstellten, wie es Wooldridge vorgeschlagen hatte. Ja sie experimentirten nicht einmal an Kaninchen, wie Wooldridge, sondern an anderen kleineren Thieren. Das Gleiche gilt von den Versuchen Gramatschikow's (36), welcher Kaninchen mit Thymusbouillon immunisirte, und zu negativen Resultaten gelangte (70).

Somit blieben die Versuche von Wooldridge ohne Nachprüfung, wenn man darunter ihre Anordnung in der Gestalt versteht, wie sie von diesem Autor vorgeschlagen wurden. Es decken sich aber die Versuche Wooldridge's mit den oben erwähnten Versuchen über Immunisirung von Kaninchen nach der Roux-Chamberland'schen Methode insofern, als bei diesen wie bei jenen Versuchen die Immunisationsmethode in intravenöser Injection grosser Vaccinemengen besteht. Die Zusammenstellung beider Methoden bringt auf die Vermuthung, ob sich die Methode nicht zur Immunisirung von Kaninchen gegen Milzbrand eigne.

Wir kommen nun zu den Versuchen über die Immunisation von Thieren gegen Milzbrand mittels Blut und Blutserum.

Roux und Chamberland (14) fanden, dass das Blut an Milzbrand verstorbener Thiere, mittels hoher Temperatur sterilisirt, immunisirende Elemente enthält. Doch ist die Immunisirung von Thieren mit solchem Material nach Angabe der Autoren schwierig, da unter dem Einfluss der hohen Temperatur die immunisirenden Principien leicht zerstört werden.

Christmas (21) suchte eine Vaccine zu erhalten, indem er mit Eucalyptussenz die Bacillen abtödtete, welche sich im Blute und in den zerstückelten Organen von Thieren befanden, die an Milzbrand zu Grunde gegangen waren. Demselben Autor gelang es, ein Filtrat von einer 5- bis 6tägigen Cultur zu erhalten, welche auf einer aus Eigelb, Eiweiss und alkalischer Bouillon bestehenden Mischung bereitet war; ein solches Filtrat besass vaccinirende Eigenschaften für Kaninchen gegen Milzbrand.

Ogata und Jasuhara (48) immunisirten Kaninchen gegen Milzbrand mit dem Blute von Fröschen und Hunden.

Gabritschewsky (33), Petermann (56), Serafini und Esiquetz (62), Petruschky (vgl. 7, 1891, S. 498), Pane (51), Bergonzini (5) wiesen die Unzulänglichkeit der erwähnten Versuche der japanesischen Autoren nach.

Bonome (7) immunisirte Mäuse mit Serum aus dem Lymphsack des Frosches und fand, dass bei Infection mit Milzbrand diese Mäuse schneller zu Grunde gingen als die Controlthiere.

Hankin (38) immunisirte Mäuse gegen Milzbrand, indem er ihnen aus dem Blute von Ratten gewonnenes Serum einspritzte.

Rummo und Bordoni (59) vergifteten Thiere mit Serum, welches aus dem Blute an Milzbrand zu Grunde gegangener Thiere gewonnen war.

Zagari (72) glaubt, dass Blut von einem Meerschweinchen, welches nach vorheriger Impfung mit Erysipelstreptokokken an Milzbrand zu Grunde gegangen ist, eine gute Vaccine gegen virulenten Milzbrand abgibt.

Brieger, Kitasato und Wassermann¹ verrieben eine Milz, die dem Leichnam einer mit Milzbrand inficirten Maus entnommen war, in Thymusbouillon und erwärmten die entstandene Mischung im Laufe von 15 Minuten auf 70° C. Durch Immunisirung mit solchem Material erzielten die Autoren eine gesteigerte Unempfindlichkeit der Mäuse gegen Milzbrand.

Es ist zu constatiren, dass die angeführten Versuche der Immunisirung mit Blut, Blutserum oder den Organen solcher Thiere, welche an Milzbrand zu Grunde gegangen waren, zweifelhafte Resultate ergaben. Bekanntlich ist die Immunisirung und die Blutserumtherapie von besonderer Bedeutung für diejenige Krankheitsgruppe, welche toxischen Mikroorganismen ihren Ursprung verdankt, wie z. B. Diphtherie und Tetanus. Was aber die Krankheiten betrifft, denen infectiöse Mikroorganismen zu Grunde liegen, so lässt sich heutzutage noch nicht sagen, ob dem Blutserum in dem Kampfe gegen diese Krankheiten eine Zukunft bevorsteht.

Wir erwähnten bereits, dass die Milzbrandbacillen bei gleichzeitigem Wachstum anderer Mikroorganismen in demselben Nährmedium an Kraft verlieren. Der Gedanke, den Antagonismus zwischen den Bakterien, der sich bei Reagensglasversuchen kundgiebt, dazu zu benutzen, um mit Milzbrand inficirte Thiere vor dem Tode zu bewahren, hat eine grosse Reihe von Versuchen hervorgerufen, welche mehr den Charakter experimenteller Therapie, als den einer Schutzimpfung tragen.

Emmerich und W. Cheyne (cit. nach Senn [61]) inficirten Kaninchen zunächst mit Erysipelstreptokokken, sodann mit Milzbrandbacillen, die Thiere blieben am Leben. Emmerich und Di-Mattei (28) sehen die Erysipelstreptokokken als immunisirendes Mittel bei allen Infectionskrankheiten an. Schutzimpfung mit Erysipelstreptokokken erzeugt Im-

¹ A. a. O.

munität, welche so lange andauert, als die Streptokokken im Blute circuliren, d. i. 3 bis 10 Tage, nach der Bestimmung von Di-Mattei.

Zagari (72), welcher die Versuche Emmerich's wiederholte, erzielte bloss eine Verzögerung des Todes der inficirten Kaninchen, doch gelang es ihm nicht, sie vom Milzbrand zu heilen.

Pawlowsky (49) unternahm eine Prüfung der Emmerich'schen Versuche und gelangte zu folgenden Resultaten. Den localen Milzbrand zu heilen, gelingt am besten mittels gleichzeitiger oder nachfolgender subcutaner Injection von Friedländer'schen Pneumokokken. Ebenso wirkt eine gleichzeitige subcutane Injection der Culturen von Staphylokokken und Milzbrandbacillen. Injicirt man bald nach der Inoculation von Milzbrandbacillen eine Cultur von *Bac. prodigiosus* in der nächsten Umgebung der ersten Inoculationsstelle, so entsteht am Orte der Einspritzung Eiterung, und das Kaninchen bleibt am Leben. Bei Allgemein-infection von Kaninchen mittels intravenöser Injection sind die Resultate unbefriedigend. Bringt man in das Blut von Kaninchen eine Cultur von Milzbrandbacillen und eine Cultur von Staphylokokken, so gehen die Kaninchen entweder an Milzbrand oder an allgemeiner Staphylokokken-infection zu Grunde. Von 8 Kaninchen, denen Friedländer's Pneumokokken und Milzbrandbacillen in's Blut injicirt wurden, blieben nur 2 am Leben, die übrigen gingen an Milzbrand zu Grunde. Das Gleiche beobachteten Bergonzini, Baumgarten, Czaplewski (vgl. 3, 1890, S. 540).

Bouchard (8) inoculirte Kaninchen unter die Haut Milzbrandbacillen und rings um die Inoculationsstelle injicirte er Culturen von *Bac. pyocyaneus*. Die Resultate waren gut. Das Gleiche fanden Blagovestschensky (6), Charrin und Guignard (17).

Pavone (3, 1887, S. 406) inficirte Meerschweinchen wiederholt mit Typhusbacillen und erzielte damit, dass der Tod durch Milzbrand langsamer eintrat als gewöhnlich; in 2 Fällen genasen die Thiere sogar vom Milzbrand.

Hueppe und Wood (41) fanden, dass subcutane Einspritzung von reinen Saprophyten die Kaninchen vor Milzbrandinfection zu schützen vermag.

Hinsichtlich der vorstehenden Versuche über Immunisirung von Thieren gegen Milzbrand durch Einspritzung von Culturen anderer Mikroorganismen kann man sagen, dass diese Versuche gleichartige Resultate ergaben, und zwar: ruft man am Orte der subcutanen Injection von Milzbrandbacillen Entzündung mit Eiterung hervor, so brauchen die Thiere nicht an Milzbrand zu Grunde zu gehen, hingegen bei intravenöser Einspritzung virulenter Milzbrandbacillen vermögen keine anderen Mikroorganismen die

Thiere vom Tode zu erretten. Jedoch auch im ersteren Falle erwerben die Thiere, welche nach gleichzeitiger Infection mit Milzbrandbacillen und anderen Mikroorganismen, Antagonisten jener, am Leben geblieben sind, keine Immunität gegen Milzbrand.

Ausser den genannten sind noch folgende Versuche bekannt:

Zagari (72) gelang es, Kaninchen gegen Milzbrand zu immunisiren, indem er an ihnen Schutzimpfungen mit Milzbrandbacillen vornahm, die auf einer sterilisirten Bouilloncultur von Spirillen asiatischer Cholera cultivirt waren. Woodhead und Wood (67, 68) sterilisirten eine zehntägige Cultur von *Bac. pyocyaneus* und heilten damit Milzbrand, oder verzögerten wenigstens seine Entwicklung. Kostjurin und Kraïnsky (44) erzielten die gleichen Resultate, indem sie faulige Substanzen einspritzten.

Es erübrigt noch, die Versuche Fodor's (32) zu erwähnen, dem es gelang, den Milzbrand der Kaninchen durch subcutane Einspritzungen einer Sodalösung zu heilen. Da nämlich Behring (4) die Immunität der Ratten gegen Milzbrand auf die relative Alkalescenz ihres Blutes zurückführt, so drängte sich der Gedanke auf, Thiere durch künstliche Steigerung ihrer Blutalkalescenz immun zu machen. Und in der That gelang es K. Müller (47), die Immunität der Ratten gegen Milzbrand auf diese Weise bis zu einem gewissen Grade zu steigern, doch gelang es nicht, den tödtlichen Ausgang abzuwenden. Chor (20) konnte die Versuche Fodor's bestätigen.

Zum Schluss sei noch der kürzlich unternommene Versuch Pawlowsky's (50) erwähnt, den Milzbrand der Thiere mit Proteïnen — Papayotin und Alerin — zu heilen. Der genannte Autor fand, dass mit Milzbrand infectirte Thiere nach Einführung der erwähnten Substanzen in ihren Körper nicht nur genesen, sondern sogar Immunität gegen Milzbrand erwarben.

Indem wir die Aufzählung der Mittel zur Immunisation der Kaninchen gegen Milzbrand beschliessen, gelangen wir zu folgenden Schlüssen. Wir besitzen bisher kein sicheres Mittel zur Immunisirung der Kaninchen gegen experimentelle Infection mit Milzbrand. Wenn die Kaninchen mit wirklich virulentem Material infectirt werden, so gehen sie unfehlbar an Milzbrand zu Grunde. Die Methode der Immunisirung von Kaninchen mit Pasteur'schen Vaccinen, wie sie von Roux und Chamberland vorgeschlagen ist, und die Immunisierungsmethode mit Thymusvaccine, welche Wooldridge proponirt hat, unterscheiden sich von allen bekannten Methoden dadurch, dass hier behufs Immunisirung grosse Mengen von Vaccine unmittelbar in's Blut eingeführt werden.

Erster Abschnitt.

Versuche mit Thymusvaccine.

Ehe wir daran gehen, die Versuche zur Immunisation von Kaninchen mit Thymusvaccine zu beschreiben, wollen wir die in der Litteratur-übersicht erwähnten Arbeiten unserer Vorgänger, die sich mit derselben Frage beschäftigt haben, genauer durchgehen, um zu zeigen, auf Grund welcher Erwägungen wir die Methode zur Bereitung der Thymusvaccine ausgewählt haben. Bekanntlich sind diese Arbeiten ziemlich spärlich. Wir sagten schon oben, dass im Jahre 1888 Wooldridge (69) als Erster die Resultate seiner Versuche mit Thymusvaccine beschrieben hat, und dass seine Idee nachher von Brieger, Kitasato und Wassermann (9) benutzt wurde, die ihre Beobachtungen im Jahre 1892 veröffentlichten. Die Erforschung derselben Frage bildet den Gegenstand der letzten, Ende 1893 erschienenen Arbeit Gramatschikow's (36). Das sind die wichtigsten Arbeiten, welche diese Methode der Schutzimpfung von Thieren gegen Milzbrand betreffen.

Wir lassen die theoretischen Erklärungen vom Wesen der Wirkung des Thymusextractes auf den thierischen Organismus unberücksichtigt, und wenden uns zum factischen Material der Mittheilungen genannter Autoren.

Aus der Arbeit von Wooldridge ersehen wir, dass es dem Autor gelang, eine grosse Zahl von Kaninchen gegen Milzbrand zu immunisiren. Die von ihm immunisirten Kaninchen blieben lange Zeit immun gegen Milzbrand; bei einem der Thiere hielt die Immunität 15 Monate an. Die beste Methode zur Herstellung der vaccinirenden Flüssigkeit besteht nach Angabe des Autors in Folgendem: entweder man stellt die Thymusdrüse vom Kalbe mit Wasser auf und kocht das Extract, oder man löst den Niederschlag, welcher im Thymusextract durch Hinzufügung von Essigsäure entsteht, in Alkalien, und sterilisirt diese Lösung, die man mit Wasser verdünnt und durch Leinwand filtrirt hat, im Dampfapparat. Es resultirt Thymusbouillon. Die letztere, mit Milzbrandbacillen inficirt, wird auf 2 bis 3 Tage in den Thermostat gestellt. Solch eine Thymuscultur, durch Kochen sterilisirt, verwandelt sich in Thymusvaccine, d. h. in eine Flüssigkeit, welche vaccinirende Eigenschaften besitzt. Wenn die Flüssigkeit beim Kochen Neigung zum Gerinnen zeigt, so wird Alkali hinzugefügt; nach dem Kochen wird die Flüssigkeit abermals durch Leinwand filtrirt.

Beim Kochen gerinnt eine grössere oder geringere Menge von „Gewebsfibrinogen“, was nach Ansicht des Autors vom Alkaligehalt abhängt. Zwar kann man, wie er angiebt, auch eine Lösung von solcher Alkalescentz her-

stellen, dass sie sich beim Kochen nicht verändern wird, doch ist es schwer, dieses im Voraus zu bestimmen, da sich das Gewebsfibrinogen durch Unbeständigkeit seiner Zusammensetzung auszeichnet, und die wässerigen Extracte, welche aus verschiedenen Exemplaren der Thymusdrüse bereitet werden, nicht von gleicher Beschaffenheit sind. Wenn der Autor der Bequemlichkeit halber als stark alkalisch diejenigen Lösungen bezeichnet, welche beim Kochen keine sichtbaren Veränderungen zeigen, so hat diese Benennung nur bedingte Bedeutung, da solche Lösungen bald starke, bald schwache alkalische Reaction aufweisen. Dabei ist aber der Alkalescentzgrad der Fibrinogenlösung von Bedeutung für die weitere Verwendung derselben als Nährmedium. So vermehren sich in stark alkalischer Lösung die Milzbrandbacillen sehr schnell und sind virulent. Solch eine Thymuscultur, die einige Tage im Thermostat gestanden hat, wirkt auf die damit inficirten Thiere äusserst giftig, die Thymusbouillon selbst dagegen, die keine Bacillen enthält, erweist sich als ungiftig. Nach der Meinung des Autors wenigstens „wirkt ein durch Filtrirpapier gewonnenes Filtrat einer Thymuscultur, den Kaninchen in's Blut injicirt, auf dieselben nicht tödtlich“. Doch erwerben solche Kaninchen durch intravenöse Injection des Filtrates einer Thymuscultur keine Immunität, und gehen, mit virulenter Milzbrandecultur inficirt, schnell zu Grunde.

Anders wirken schwach alkalische Lösungen von Gewebsfibrinogen. Die Milzbrandbacillen wachsen entweder gar nicht in schwach alkalischen Lösungen, oder, wenn sie auch wachsen, so verlieren sie ihre Virulenz. Immerhin gewinnt man den Eindruck, dass die Virulenz der Bacillen in schwach alkalischen Lösungen nicht immer in genügendem Maasse abgeschwächt wird, da aus dem weiteren Gange der Arbeit ersichtlich ist, dass der Autor die Filtration solcher Thymusculturen durch Löschpapier nicht für hinreichend hält, um die Bacillen aus der Cultur zu entfernen. Dieselben dürfen aber in schwach alkalischer Fibrinogenlösung absolut nicht vorhanden sein, falls man daraus in correcter Weise Thymusvaccine bereiten will, welche behufs Immunisirung von Kaninchen denselben in's Blut injicirt werden soll. Der Autor empfiehlt deshalb, die Bacillen in der Thymuscultur durch Kochen zu tödten. Injicirt man solch eine durchgekochte Thymuscultur Kaninchen in's Blut, so werden die letzteren immun gegen Milzbrand.

Der Autor macht darauf aufmerksam, dass von 9 Versuchen über Immunisirung von Kaninchen mit Thymusvaccine, welche nach der letztgenannten Methode bereitet wurde, nur einer misslang, und zwar deshalb, weil beim Kochen der Thymuscultur das gesammte Eiweiss sich niederschlug, so dass die Lösung hernach ein durchsichtiges Filtrat gab, aus welchem durch Essigsäure kein Niederschlag zu bekommen war.

Da es schwierig ist, sich nach der vorläufigen Mittheilung Woolldridge's eine klare Vorstellung von dem Wesen seiner Methode zu bilden, so müssen wir aus der detaillirten Beschreibung seiner Versuche Klarheit zu gewinnen suchen. Der Autor beschreibt 4 Versuche von Immunisirung der Kaninchen mit Thymusvaccine. Die ersten 2 Versuche wurden am 10. November 1887 ausgeführt. Die dabei verwandte Thymusvaccine wurde auf folgende Art zubereitet. Das wässerige, schwach alkalische Thymus-extract wurde durchgekocht und gab dabei einen bedeutenden Niederschlag, nach dessen Entfernung durch Filtration eine opalescirende Flüssigkeit zurückblieb, welche durch Essigsäure fällbares Eiweiss enthielt. Die sterilisirte Thymusbouillon wurde mit Milzbrandbacillen infectirt und auf 3 Tage in den Thermostat gestellt. In der 3tägigen Thymuscultur bildete sich ein flockiger Niederschlag am Boden des Kolbens; die oberste Schicht der Thymuscultur wurde abgossen, die Flüssigkeit filtrirt und durchgekocht.

I. Versuch. Einem Kaninchen von 4 Pfund wurden in die Jugularvene 30^{cem} Thymusvaccine injicirt, und darauf wurde unter die Haut Blut eingespritzt, das dem Herzen eines an Milzbrand zu Grunde gegangenen Meerschweinchens entnommen war.

II. Versuch. Einem 2^{1/2} Pfund schweren Kaninchen wurden an verschiedenen Körpertheilen 25^{cem} Thymusvaccine unter die Haut eingespritzt, und das Thier darauf in derselben Weise, wie im ersten Versuch, mit Blut vom Meerschweinchen infectirt. Zur Controle wurde auch ein Meerschweinchen mit dem gleichen Blute infectirt.

Die Versuche ergaben folgende Resultate. Das Meerschweinchen ging 2 Tage nach der Infection zu Grunde. Allein da es nicht mitgetheilt ist, ob die Leiche bakteriologisch untersucht wurde, so bleibt es unbekannt, woran das Meerschweinchen gestorben ist. Der Autor nimmt an, dass Milzbrand die Todesursache war. Das Kaninchen, welches zum zweiten Versuche gedient hatte, ging 3 Tage nach der Infection zu Grunde, nach Ansicht des Autors an Milzbrand, obwohl auch in diesem Falle die Resultate der bakteriologischen Untersuchung der Leiche nicht mitgetheilt sind. Das erste Kaninchen, welchem Thymusvaccine injicirt worden war, blieb am Leben und gesund, und überstand auch wohlbehalten eine zweite Milzbrandinfection. Der Autor verschweigt, mit welchem Material die zweite Infection ausgeführt wurde.

Die beiden folgenden Versuche wurden am 28. April 1888 ausgeführt. Die Thymusvaccine, welche dabei benutzt wurde, war folgendermassen bereitet. Das wässerige Thymusextract, von dessen Reaction der Autor nichts erwähnt, wurde gekocht, wobei ein Niederschlag entstand. Nach Hinzufügung von Wasser wurde die Flüssigkeit durch Leinwand filtrirt,

das opalescirende Filtrat zum zweiten Male durchgekocht, mit Milzbrandbacillen geimpft und auf 2 Tage in den Thermostat gestellt. Da der Autor bemerkte, dass in der betreffenden Thymuscultur die Bacillencolonieen sich sehr gut entwickelten, so kann man auf Grund des früher Gesagten annehmen, dass das Thymusextract stark alkalische Reaction besass, und nicht schwach alkalische, bei welcher nach Angabe desselben Autors die Milzbrandbacillen in Thymusbouillon fast gar nicht wachsen. Die auf die geschilderte Weise bereitete Thymuscultur von Milzbrand wurde in zwei Theile getheilt. Der eine Theil wurde nicht gekocht, sondern nur durch schwedisches Papier¹ filtrirt. In dem Filtrat, welches stark opalescirte, fanden sich Milzbrandbacillen. Der zweite Theil der Thymuscultur wurde einige Minuten gekocht und durch Leinen durchgelassen.

I. Versuch. Einem Kaninchen, dessen Alter und Gewicht nicht angegeben sind, wurden in die Jugularvene 40 ^{cem} der Thymuscultur eingeführt, die nicht vorher gekocht worden war (erster Theil), und darauf das Ohr des Kaninchens mit dem Blute eines an Milzbrand zu Grunde gegangenen Thieres inficirt. Nach 2 Tagen starb das Kaninchen an Milzbrand — im Blute wurden post mortem Milzbrandbacillen gefunden. Bei der Section fanden sich am inficirten Ohre des Kaninchens keinerlei Veränderungen, dagegen war Oedem des Zellgewebes am Bauche vorhanden.

II. Versuch. Einem Kaninchen, dessen Gewicht gleichfalls nicht angegeben ist, wurden in die Ohrvene 30 ^{cem} Thymusvaccine injicirt, d. h. Thymuscultur, welche gekocht und filtrirt worden ist (zweiter Theil); darauf wurde das Kaninchen mit dem gleichen Blute inficirt, welches auch beim ersten Versuche benutzt worden war. Nach der Infection waren bei dem Kaninchen keinerlei Krankheitserscheinungen zu bemerken, ausser einer geringen Röthe an der Inoculationsstelle; das Kaninchen war gesund und blieb sogar nach einer nochmaligen Milzbrandinfection am Leben, wenn auch der Autor nicht mittheilt, auf welche Weise und mit welchem Material die letzte Infection vorgenommen wurde.

Indem Wooldridge die Beschreibung seiner Versuche schliesss, stellt er die These auf, dass die nach seiner Methode bereitete Thymusvaccine die Kaninchen nur in dem Falle schützt, wenn sie subcutan mit Milzbrand inficirt werden, und dass bei anderen Methoden der Infection die Thymusvaccine die Kaninchen nicht vor dem Tode schützt.

¹ Der Autor sieht sich veranlasst, auf die Bedeutung des Filters aufmerksam zu machen, und rath, dasselbe beim Filtriren des Thymus-Extractes mehrmals zu wechseln, denn nur die ersten Portionen des Filtrates werden trübe, später, wenn die Poren des Papiers sich verstopfen, kommt eine klare Flüssigkeit heraus, welche zur Vaccination untauglich ist.

Nachdem wir uns mit dem Inhalt der Wooldridge'schen Arbeit bekannt gemacht haben, wollen wir einmal den Weg betrachten, welchen der Autor bei der Ausarbeitung seiner Vaccinationsmethode gegangen ist. Mit der Frage von der Blutgerinnung beschäftigt, stiess Wooldridge zufällig auf Erscheinungen, welche eine unverkennbare Verwandtschaft mit denjenigen Erscheinungen zeigten, die im Blute des lebenden Organismus statthaben, wenn sich in demselben künstliche Immunität entwickelt. Nach Ansicht des Autors spielt dabei die Hauptrolle das Fibrinogen, was ihn auch veranlasste, als Nährsubstanz eine Flüssigkeit zu benutzen, welche dem Gewebssafte nahe stehen sollte, um die Veränderungen zu verfolgen, welche in derselben beim Wachsthum der Mikroorganismen stattfinden würden. Er dachte sich, dass aus jedem Gewebe eine Substanz zu gewinnen sein müsse, welche, dem Fibrinogen des Blutes verwandt, unter dem Einflusse desselben gerinnen würde, ebenso wie das Blut gerinnt, welches aus dem verletzten Gefäss in's Gewebe ausgetreten ist. Deshalb schlug der Autor die Benennung „Gewebsfibrinogen“ vor, und nahm dabei an, dass eine Lösung desselben in Gestalt eines wässerigen Thymusextractes auch nach dem Kochen einen Theil ihrer physiologischen Eigenschaften behalten wird.

Beim Wachsthum der Milzbrandbacillen in Fibrinogenlösung werden folgende Erscheinungen beobachtet. Die Thymuscultur bleibt nicht nur ungiftig für Thiere, sondern verleiht ihnen sogar, wenn die Bacillen abgetödtet sind, Immunität. Wenn man aber die Fibrinogenlösung, bezw. das Thymusextract oder die Thymusbouillon von dem darin suspendirten Eiweiss durch Filtration befreit, so dass eine durchsichtige Flüssigkeit resultirt, so verliert sie ihre immunisirenden Eigenschaften. Daraufhin nimmt der Autor an, dass das wirksame Princip der Thymusvaccine allein im Fibrinogen enthalten ist, welches unter dem Einflusse des Wachsthums der Milzbrandbacillen sich in uns unbekannter Weise ändert. Auf eine Aenderung des Fibrinogens unter dem Einflusse der Milzbrandbacillen weist die Gerinnung seiner Lösung beim Kochen der Thymusculturen hin. Das Fibrinogen wird wahrscheinlich deshalb wieder empfindlich gegen das Kochen, weil derjenige Theil desselben, welcher in der Thymusbouillon die Fähigkeit besass, der Gerinnung beim Kochen zu widerstehen, in der Thymuscultur gespalten erscheint. Bei der Unbeständigkeit des Fibrinogens genügt nach Ansicht des Autors der geringste Anlass, wie z. B. ein unbedeutendes Wachsthum der Milzbrandbacillen, um eine Veränderung des Fibrinogens hervorzurufen. Von der letzten Annahme ausgehend, kam der Autor auf den Gedanken, dass es möglich sein müsse, auch ohne Betheiligung der Bacillen eine immunisirende Fibrinogenlösung zu erhalten. Zur Erhärtung dieser Annahme vollzog

der Autor zwei Versuche an Kaninchen, welche er mit Thymusvaccine immunisirte, die folgendermassen hergestellt war. Das Extract der Drüse wurde durchgekocht, wobei die Fibrinogenlösung gerann. Die geronnene Masse wurde dergestalt durch Leinwand durchgepresst, dass das Filtrat einer Emulsion glich, in welcher die feinsten Eiweisstheilehen suspendirt enthalten waren. Das Kochen spielte dabei dieselbe Rolle, wie die Milzbrandbacillen beim Herstellungsprocess der anderen, oben geschilderten Thymusvaccine. Die beiden Kaninchen, denen solche Thymusvaccine eingeführt war, wurden unempfänglich gegen Milzbrand.

Nach kurzer Beschreibung seiner letzten Versuche beschränkt sich der Autor auf die Bemerkung, dass das Geheimniss der Bereitung der immunisirenden Fibrinogenlösung ohne Bethheiligung der Bacillen nur darin bestehe, dass man das Thymusextract so kochen müsse, dass es nicht gerinne, und dabei eine möglichst kleine Menge Alkali hinzufüge. Was das Letztere betrifft, so kann man nicht genau bestimmen, wie viel davon zur Erzielung einer tauglichen Thymusvaccine erforderlich sei, weil verschiedene Thymusextracte, wie oben erwähnt, von ungleicher Zusammensetzung sind. Wichtig ist dabei die Methode der Filtration der Thymusbouillon, da es passiren kann, dass die wirksamen Elemente der Vaccine auf dem Filter aufgehalten werden. Mit dem hier Mitgetheilten ist der wesentliche Inhalt der Wooldridge'schen Arbeit auch erschöpft.

Beim Durchgehen dieser Arbeit sehen wir, dass Vieles in der Mittheilung des Autors nur angedeutet ist. Er hat sich augenscheinlich beeilt, seine ersten Beobachtungen zu publiciren, ohne sie genügend geprüft zu haben, daher finden sich in der Arbeit Widersprüche. Nach der Mittheilung von Wooldridge ist es schwer zu verstehen, wie die Thymusvaccine richtig zu bereiten ist. Der Autor dachte Anfangs, man könne die Thymusvaccine nur mit Hülfe der Milzbrandbacillen gewinnen, dann aber erwies es sich, dass die meiste Bedeutung dem Filter zukommt, und nicht den Bacillen, und dass das Gelingen der Herstellung der Thymusvaccine vielfach von Zufälligkeiten abhängt.

Aus der obigen Beschreibung der vier Versuche geht hervor, dass sie keineswegs vorwurfsfrei angeordnet waren: die Kaninchen wurden unpassend ausgewählt, und das Material zur Controlinfection der immunisirten Kaninchen entspricht nicht den Anforderungen, welche an eine experimentelle Infection von Thieren gestellt werden dürfen. So z. B. wog in den ersten beiden Versuchen das eine Kaninchen, welches nach der Infection am Leben blieb, fast doppelt so viel wie das Controlthier, welches zu Grunde ging. Der Autor berichtet nichts über Alter, Geschlecht und Rasse der Kaninchen, Details, welche, wie unsere Versuche zeigen, von

Bedeutung für die Beurtheilung der Infectionsversuche an Kaninchen sein können. Wir werden bald sehen, dass man zwei Kaninchen aussuchen kann, von denen das eine, ein altes Männchen, nach der Infection völlig gesund bleibt, während das andere, ein junges, trächtiges Weibchen, zu Grunde gehen wird, wenn man die beiden Thiere, ohne eine Schutzimpfung vorgenommen zu haben, mit der gleichen Menge einer virulenten Cultur inficirt. Zu den Mängeln der Beschreibung der Wooldridge'schen Versuche gehört auch noch der Umstand, dass er nichts von einer bakteriologischen Untersuchung der nach der Infection verstorbenen Thiere erwähnt; nimmt man aber auch an, dass bei den ersten Versuchen das Meerschweinchen unzweifelhaft an Milzbrand zu Grunde ging, so verfuhr der Autor jedenfalls uncorrect, indem er ein Meerschweinchen als Controlthier für Kaninchen benutzte.

Wenn uns also die Qualität und Quantität des zur Infection der Kaninchen benutzten Materials unbekannt sind, wenn der Autor die individuelle Verschiedenheit der Thiere nicht berücksichtigt hat, so berechnen uns solche Versuchsbedingungen zu der Annahme, dass die intravenöse Injection von Thymusvaccine den Ausgang der Infection ebenso beeinflussen konnte, wie etwa eine Einspritzung von Aqua destill.

Ebenso zweifelhaft erscheinen die Resultate der zweiten Versuchsreihe. So wurden z. B. im ersten Versuche dem Kaninchen 40^{cem} Thymuscultur in's Blut injicirt, dann das Ohr des Kaninchens mit Milzbrand inficirt — das Thier ging zu Grunde. Da der Autor es nicht für nöthig erachtet hat, zur Controle noch einem anderen, nicht mit Blut inficirten Kaninchen die Thymuscultur einzuspritzen, so bleibt es unbekannt, was als Quelle der Infection des Kaninchens gedient hat, die Thymuscultur, welche durch Löschpapier filtrirt wurde, oder das Blut des Meerschweinchens. In der zweiten Versuchsgruppe ist das Gewicht der Kaninchen gar nicht angegeben.

Endlich ist noch zu bemerken, dass die Zahl der Versuche, die der Autor ausgeführt hat (8), bei Weitem nicht genügt, um daraufhin die Frage von der Immunisirung der Kaninchen mit Thymusvaccine zu entscheiden; obgleich der Autor Eingangs seiner Mittheilung erklärt, dass er viele gelungene Versuche ausgeführt hat und von dem Werthe seiner Vaccinationsmethode ganz überzeugt ist.

Die Versuche von Wooldridge erregten Aufsehen in der Litteratur und blieben nicht lange ohne Nachprüfung. Die Untersuchungen Wooldridge's wurden von Brieger, Kitasato und Wassermann fortgesetzt. Diese Autoren schildern die Bereitung des Thymusantitoxin folgendermassen. Zwei oder drei Thymusdrüsen, welche soeben getödteten Kälbern entnommen sind, werden fein gehackt und zur Hälfte mit Wasser ver-

mischt; die Mischung wird aufgeschüttelt und auf 12 Stunden in einen Eiskasten gestellt; der Aufguss wird durch Gaze hindurchfiltrirt, die festen Theile ausgepresst, das Filtrat mit der gleichen Raummeng Wasser verdünnt und mit Soda bis zu schwach alkalischer Reaction versetzt. Das Thymusextract kocht bei 100° C. 15 Minuten. Die entstandene dunkelgrau-braune Thymusbouillon wird nach dem Erkalten noch einmal durch feines Leinen hindurchgelassen, in Probirröhrchen gegossen und nochmals sterilisirt. In solcher Thymusbouillon entsteht durch Hinzufügung von einem Tropfen Essigsäure ein voluminöser Niederschlag.

Die in der Thymusbouillon gezüchteten Milzbrandculturen wurden bei 100° C. 10 Minuten lang sterilisirt. Die auf obengeschilderte Weise bereitete Thymusvaccine diente zur Immunisirung von weissen Mäusen und Meerschweinchen. Die Immunisirungsversuche wurden an 150 weissen Mäusen und 35 Meerschweinchen angestellt. Die Schutzimpfung der Thiere dauerte von einem Tage bis zu 8 Wochen, und bestand darin, dass die Thymusvaccine in verschiedenen Dosen von 0.2 bis 1.0 in die Bauchhöhle eingeführt wurden. Die Autoren nahmen als Postulat an, dass die immunisirten Mäuse die subcutane Inoculation eines Milzstückchens, das einer an Milzbrand zu Grunde gegangenen Maus entnommen ist, ohne Schaden vertragen müssen.

Als alle derartigen Impfungen ein negatives Resultat ergaben, da wandten die Autoren eine andere Methode an, die im Folgenden besteht.

Eine Milz, einem an Milzbrand zu Grunde gegangenen Meerschweinchen entnommen, wurde mit 30^{cem} Thymusbouillon verrieben und im Laufe von 15 Minuten auf 70° C. erwärmt. Die so entstandene Emulsion wurde 2 Wochen hindurch täglich in die Bauchhöhle von Mäusen und Meerschweinchen eingeführt. Bei solcher Schutzimpfung gelang es, einen gewissen Grad von Unempfänglichkeit zu erzielen, welche darin zum Ausdruck kam, dass die immunisirten Thiere, wenn sie nachher mit Milzstückchen inficirt wurden, etwas später an Milzbrand zu Grunde gingen, als die Controlthiere. Mit dieser Methode machten die Autoren eine Anzahl von Mäusen unempfänglich für die Infection mit einer Milzbrandcultur, welche die Controlmäuse in 60 Stunden tödtete. Solche Resultate konnten aber nur dann erreicht werden, wenn die Schutzimpfung der Mäuse folgendermassen verstärkt wurde. Eine Milz, die der Leiche einer an Milzbrand gestorbenen Maus entnommen war, wurde mit Thymusbouillon soweit verrieben, dass man bei mikroskopischer Untersuchung der Emulsion im Gesichtsfelde einen oder zwei Bacillen sehen konnte. Den Mäusen wurde die Emulsion mit der Schlinge einer Platinanadel an der Schwanzwurzel unter die Haut eingeführt; die nach verstärkter Methode immunisirten Mäuse vertrugen die mit der Nadelschlinge

ausgeführte Infection mit einer virulenten Cultur, welche die Controlmäuse in 60 Stunden tödtete. Jedoch erwiesen sich nicht alle Mäuse als gleichmässig immunisirt, denn von 30 immunisirten Mäusen blieben nur 12 nach der Infection am Leben, und auch diese gingen alle, ohne Ausnahme, ebenso schnell wie die Controlthiere zu Grunde, als ihnen 2 Wochen später Milzstückchen vom Leichnam einer an Milzbrand gestorbenen Maus unter die Haut gebracht wurden. Versuche mit Meerschweinchen ergaben ebenso negative Resultate, wie die oben geschilderten Versuche mit weissen Mäusen.

Am Schluss ihrer Untersuchung sagen die Autoren, dass, obwohl die Mäuse und Meerschweinchen, die mit Thymusvaccine immunisirt wurden, bisweilen eine gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegen die Milzbrandinfection zeigten, es doch nie gelang, sie wirklich immun gegen Milzbrand zu machen, wenn man als wirklich immun nur solche Thiere ansieht, die am Leben bleiben nach Infection mit Organstückchen, welche lebensfähige Bacillen enthalten. Nach Ansicht der Autoren sind die Versuche von Wooldridge nicht beweiskräftig, weil da nicht alle Kaninchen an der Milzbrandinfection zu Grunde gingen; dabei dienten als Controlthiere bei den Kaninchenversuchen Meerschweinchen, welche gegen Milzbrand sehr empfindlich sind; die letzteren gingen constant an der Milzbrandinfection zu Grunde.

Brieger, Kitasato und Wassermann hatten bei ihren Versuchen mit den Milzbrandbacillen einen Misserfolg zu verzeichnen; andererseits fanden die Autoren in der Thymusbouillon ein sicheres Mittel, um dem Krankheitsprocess, welcher von den Bacillen des Schweinerothlaufes hervorgerufen wird, nicht nur vorzubeugen, sondern auch die schon begonnene Entwicklung derselben zu unterbrechen. Diese Thatsache ist nicht recht verständlich, da die Autoren streng unterscheiden zwischen einer Gruppe infectiöser Mikroorganismen, unter denen die Bacillen des Milzbrandes und des Schweinerothlaufes in erster Reihe stehen, und einer Gruppe toxischer Mikroorganismen, zu denen die Tetanusbacillen, die Spirillen der asiatischen Cholera u. a. gehören. Die Thymusbouillon, welche antitoxische, nicht aber baktericide Eigenschaften besitzt, wirkt nur auf die Gruppe der toxischen Mikroorganismen, und gab nach den Versuchen der Autoren glänzende Resultate bei Tetanus. Kaninchen und Mäuse, die mit Tetanusantitoxin immunisirt wurden, erwarben wirkliche Immunität gegen den Tetanus. Als Antitoxin diente eine Mischung aus einer Bouilloncultur von Tetanusbacillen und Thymusextract; dieselbe hatte einige Zeit auf dem Eise gestanden zur Abschwächung des Tetanusgiftes durch das Thymusextract. Die Versuche mit den Spirillen der asiatischen Cholera ergaben auch gute Resultate. Das Antitoxin der asiatischen Cholera

wurde aus einer Thymuscultur der Choleraspirillen hergestellt durch 10 Minuten lange Erwärmung der Cultur auf 65° C.

Wir sehen also, dass die Autoren, während sie bei dem Schweine-rothlauf aus irgend einem Grunde gute Resultate erzielten, bei der Milz-brandvaccination einen Misserfolg erlitten.

Vergleichen wir die Versuche von Brieger, Kitasato und Wassermann mit denjenigen von Wooldridge, so sehen wir, dass die erstgenannten Autoren die Thymusvaccine zwar ebenso zubereiteten, wie es Wooldridge empfahl, ihre Thiere aber anders immunisirten, als es letzterer vorgeschlagen hatte. Wooldridge injicirte sein „Gewebsfibrinogen“ Kaninchen, und zwar direct in's Blut; die genannten drei Autoren spritzten das Thymusantitoxin Mäusen und Meerschweinchen in die Bauchhöhle. Nimmt man nun auch an, die Letzteren Versuche an Mäusen und Meerschweinchen seien vorwurfsfrei in jeder Hinsicht, so folgt daraus noch nicht, dass sie die von Wooldridge an den Kaninchen erzielten Resultate widerlegen.

Brieger, Kitasato und Wassermann erklären die Wirkung des Thymusantitoxins in folgender Weise. Im thierischen Organismus bilden sich bei normalem Stoffwechsel Zwischenproducte und Fermente, unter denen einige, z. B. die Peptone, Trypsin, Pancreatin, starke Gifte für den sie ausarbeitenden Organismus sind. Diese Gifte circuliren aus vielen Gründen im Organismus ohne Schaden für denselben. Eine nicht unwichtige Rolle spielen bei der Befreiung des thierischen Organismus von den toxischen Substanzen einige zellenreiche Organe, deren physiologische Function bis heute noch nicht ganz aufgeklärt ist, wie Milz, Thymusdrüse, Schilddrüse und auch die Lymphdrüsen. Viele Thatsachen sprechen für die giftzerstörende Function dieser Organe (Horsley, Lindemann, Vassale). In gewissen Drüsen bilden sich antitoxische Substanzen und treten von da in's Blut. Die Autoren versuchten Anfangs aus dem Eiter die Zerfallproducte der weissen Blutkörperchen zu isoliren, Nuclein und Nucleinsäure, und als sie in den damit angestellten Immunisirungsversuchen zu negativen Resultaten kamen, wandten sie sich zu dem wässerigen Thymusextract, in welchem sie das Vorhandensein von antitoxischen Substanzen vermutheten. Die Versuche der Autoren bestätigten ihre Erwartungen, und stellten zwei Thatsachen fest: 1. aus einigen, gesunden Thieren entnommenen, zellenreichen Organen kann man antitoxischwirkende Substanzen darstellen; 2. Bakterienkulturen, auf welche man antitoxische Substanzen hat einwirken lassen, schützen Thiere vor Infection. Die Immunität, welche entsteht, ist eine specifische, nur auf einen bestimmten Mikroorganismus bezügliche, und erstreckt sich

nicht auf andere Mikroorganismenarten. Die Autoren glauben, das immunisirende Princip befinde sich im Körper der Mikroorganismen.

Gramatschikow machte sich speciell die Prüfung eines Theils der Wooldridge'schen Versuche zur Aufgabe, nämlich derjenigen Versuche, wo die Kaninchen mit Thymusbouillon immunisirt wurden, welche nicht mit Milzbrandbacillen inficirt war. Bekanntlich hat Wooldridge diese Versuche am Ende seiner Arbeit kurz und ungenau beschrieben. Gramatschikow wählte zur Bereitung der Thymusbouillon folgende Methode. Fein gehackte Thymusdrüse wird auf 24 Stunden mit Chloroformwasser (1:200) aufgestellt; das Chloroform verhindert die Selbstverdauung des Fibrinogens und hält die Fäulniss des Thymusextractes auf. Das Thymusextract wird auf neutrale Reaction gebracht, gekocht, durch schwedisches Papier filtrirt und 15 Minuten lang in der Autoclave sterilisirt. Es resultirt Thymusvaccine.

Die Versuche Gramatschikow's zeigen, dass Kaninchen, denen so dargestellte Thymusvaccine in die Ohrvene injicirt wurde, an Blutgerinnung zu Grunde gehen; diejenigen Kaninchen dagegen, welchen die Thymusvaccine in die Bauchhöhle eingeführt worden ist, verlieren schnell an Gewicht. Von 6 Kaninchen, welchen Thymusvaccine in die Bauchhöhle injicirt wurde, hielten 3 eine Controlinfection mit Milzbrand aus; allerdings blieb auch das nicht vaccinirte Controlkaninchen am Leben. Diese Resultate seiner Versuche erklärt Gramatschikow dadurch, dass zur Infection der Kaninchen eine asporogene Cultur benutzt wurde, welche nach der Roux'schen Methode in Carbolbouillon zubereitet war. Diese asporogene Cultur tödtete Kaninchen häufig gar nicht, und Meer-schweinchen erst in 5 Tagen nach der Infection. In Anbetracht dieses Mangels der asporogenen Cultur verwandte der Autor bei seinen weiteren Versuchen zur Infection der Kaninchen eine Emulsion, aus einer Agarcultur von Milzbrandbacillen hergestellt, welche Kaninchen in 2 bis 3 Tagen nach der Inoculation tödtete. Bei der Controlinfection von Kaninchen mit der geschilderten Emulsion erhielt der Autor in allen Immunisirungsversuchen mit Thymusvaccine negative Resultate, obgleich ausser der Thymusbouillon zur Vaccination auch Thymusextract benutzt wurde, das nicht gekocht worden war. Es ist nur zu constatiren, dass einige der vaccinirten Kaninchen die Controlthiere überlebten und nach 102 bis 134 Stunden nach der Infection starben.

Somit vermochten die Versuche Gramatschikow's die positiven Resultate der Vaccinationsversuche an Kaninchen mit nicht inficirter Thymusbouillon nicht zu bestätigen; andererseits widerlegten sie aber auch nicht die wichtigsten Versuche Wooldridge's, bei welchen dieser

Autor Kaninchen immunisirte, indem er ihnen in's Blut Thymusvaccine injicirte, die aus einer Thymuscultur von Milzbrandbacillen hergestellt war.

Ausser den genannten Autoren experimentirten auch Petermann und Landi mit dem Thymusextract, erzielten aber ebenso negative Resultate wie Brieger, Kitasato und Wassermann (cit. nach Gamaleia [35]).

Wright (71) ordnete seine Versuche analog denjenigen von Gramatschikow an; er sterilisirte die Thymusbouillon durch Chamberland'sche Kerzen. Mit der Thymusvaccine immunisirte der Autor 12 Kaninchen, welche sodann einer Controlinfection mit Milzbrand unterworfen wurden; einige davon blieben nach der Infection am Leben, ebenso wie das nicht vaccinirte Controlkaninchen.

Es ergibt sich also aus einer Uebersicht über die Frage von der Vaccination der Thiere mit Thymusextract, dass die Versuche von Wooldridge bisher nicht in der Weise wiederholt worden sind, wie sie der Autor selbst ausgeführt hat. Angesichts dieser Thatsache, sowie dessen, dass Brieger, Kitasato und Wassermann gute Resultate erzielten nicht nur für toxische Mikroorganismen, sondern auch für die Bacillen des Schweinerothlaufes, welche in der infectiösen Gruppe den Milzbrandbacillen nahe stehen, gingen wir an eine Wiederholung der Immunisierungsversuche an Kaninchen nach der Wooldridge'schen Methode.

Die Thymusvaccine, welche zu unseren Versuchen diente, wurde folgendermassen hergestellt. Die frischen Drüsen¹ wurden von Fett und Fascien gereinigt, in kleine Theile zerschnitten und mit der doppelten Gewichtsmenge destillirten Wassers vermischt; die Mischung wurde auf 20 Stunden in einen Eiskasten gestellt; es entstand eine rosafarbene, schlüpfrige und klebrige Masse, welche unter der Presse durch Marly hindurchgedrückt wurde; das Extract wurde mit der gleichen Raummenge Wasser verdünnt. Mittels einer Sodalösung wurde eine schwach alkalische, fast neutrale Reaction hergestellt, bei welcher blaues Lackmuspapier den Grundton seiner Farbe ein wenig verstärkte, rothes sich leicht bläute. Fügte man einige Tropfen einer 1procent. alkoholischen Lösung von Phenol-Phthalein hinzu, so nahm das Thymusextract, wenn man 10^{cem} davon genommen hatte, eine schwache Rosafärbung an, welche in Grellrosa-Färbung überging, wenn ein Tropfen einer mit destillirtem Wasser 20mal verdünnten, normalen Aetznatronlösung hinzugefügt wurde, — und eine gesättigt rothe Farbe annahm, durch einen Tropfen unverdünnter, normaler Aetznatronlösung. Das Thymusextract, welches die obengeschil-

¹ Direct vom Schlachthause geliefert.

derte Reaction besass, wurde 15 Minuten lang im Dampfapparat bei 100° C. sterilisirt, wobei ein geringer flockiger Niederschlag entstand, welcher in der milchigen, trüben, dunkelbräunlich gefärbten Flüssigkeit schwer zu unterscheiden war. Dieser Niederschlag setzte sich alsbald auf den Boden des Kolbens, wodurch es möglich wurde, ihn zu isoliren, indem man die oberen Schichten der Flüssigkeit abgoss. In der resultirenden Thymusbouillon entstand durch Hinzufügung eines Tropfens Essigsäure (*acidi acetici glacialis*) ein voluminöser, flockiger Niederschlag, welcher Anfangs die ganze Flüssigkeit einnahm, darauf sich zu Boden setzte, und nach 3 Stunden einen leicht beweglichen, gallertartigen, undurchsichtigen Satz in der durchsichtigen, leicht opalescirenden Flüssigkeit bildete.

Diese Details der Bereitung des Thymusextractes, welches bei unseren Versuchen benutzt wurde, sind deshalb angeführt, weil Wooldridge und die anderen Autoren, welche mit Thymusextract gearbeitet haben, der genauen Normirung der Reaction des Thymusextractes grosse Bedeutung beilegen, was ihrer Ansicht nach wichtig ist, um Eiweissgerinnung bei der Sterilisation zu vermeiden. In dieser Hinsicht geht die Vorsicht von Brieger, Kitasato und Wassermann so weit, dass diese Autoren empfehlen, in jedem einzelnen Falle empirisch im Reagensglase diejenige Menge von Soda und Wasser festzustellen, bei welcher der Niederschlag am geringsten sein wird, da die Zusammensetzung der Thymusdrüse bei verschiedenen Thieren verschieden ist. Fedorow (30) gelang es, einen stärkeren Niederschlag bei der Sterilisirung des Thymusextractes zu vermeiden, indem er dem Extract eine gleiche Raummenge Wasser hinzufügte und durch Sodalösung eine schwach alkalische Reaction herstellte. Das von Fedorow bereitete Thymusextract gab beim Kochen keinen Niederschlag; wenn es aber doch einmal vorkam, dass ein geringer Niederschlag herausfiel, so konnte er leicht durch Filtriren entfernt werden.

Die gleiche Beobachtung konnte man auch bei der Herstellung unserer Thymusvaccine machen. Das Thymusextract, welches die obengeschilderte schwach alkalische Reaction besass, wurde 15 Minuten im Dampfapparat bei 100° C. gekocht. Gleich nach dem Auftreten des Thymusextractes in einem grossen Kolben entstand ein geringer flockiger Niederschlag, welcher mittels Filtration durch feines Leinen entfernt wurde. Aus solcher Thymusbouillon wurden Flüssigkeiten von verschiedener Concentration hergestellt: die Thymusbouillon wurde verdünnt mit der gleichen Menge Wasser, mit der doppelten, der 3-, 4-, 5- und endlich mit der 6fachen Menge. Ein Theil der Thymusbouillon wurde unverdünnt in einem besonderen Kolben belassen; die verschieden concentrirte Thymusbouillon wurde theils in Reagensgläschen zu 30^{cem}, theils in Erlenmeyer'schen Kölbchen zu 200^{cem} vertheilt.

Nach der Sterilisation stellte die starke, im Kolben befindliche Thymusbouillon eine weniger durchsichtige, milchige Flüssigkeit von leicht bräunlicher Färbung dar; am Boden war ein unbedeutender Niederschlag, die Reaction auf Essigsäure und der Grad der Alkalescentz waren unverändert geblieben. Die Thymusbouillon, welche mit Wasser verdünnt war, blieb in den Reagensgläsern durchsichtig und in verschiedenem Grade opalescirend, je nach der Verdünnung mit Wasser. Die fertig gestellten Nährmedien wurden 2 Monate lang am dunklen Orte aufbewahrt, und erlitten im Laufe dieser Zeit keine bemerkbare Veränderung. Thymusbouillon, die mit einer homogenen Cultur von Milzbrandbacillen inficirt war, wurde auf 2 oder 3 Tage in den Thermostat gestellt; in der Thymuscultur bildete sich ein voluminöser flockiger Niederschlag, welcher sich von dem ursprünglichen Niederschlage der Thymusbouillon durch seinen Umfang unterschied, sowie durch die Leichtigkeit, mit welcher er beim Schütteln in die Höhe stieg. Die dem Thermostat entnommene Thymuscultur wurde der Wirkung der Wärme ausgesetzt, sie wurde entweder im Dampfapparat gekocht, oder im Wasserbade auf verschiedene Temperaturen erwärmt. Die Immunisirungsversuche mit dieser Thymusvaccine wurden in Serien, in bestimmter Reihenfolge ausgeführt.

Mit dem 17. Versuche schliesst die erste Serie der Versuche zur Schutzimpfung von Kaninchen mit Thymusvaccine ab.

Alle Kaninchen, welche zu den vorstehenden 17 Versuchen gedient haben, gingen zu Grunde, theils nach der Injection von Thymusvaccine — Versuche 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, theils nach der Controlinfection mit Milzbrand — Versuche 3, 4, 8, 13, 14, 15, 16 und 17. Dementsprechend sind nachstehende zwei Tabellen zusammengestellt.

Bei der am 31. Januar vorgenommenen ersten Infection der Kaninchen von der zweiten Tabelle, wozu eine virulente Cultur benutzt wurde, diente als Controlthier ein weisses Weibchen von 600 ^g_{mm} Gewicht. Das Material zur Infection der Kaninchen dieser Gruppe wurde folgendermassen bereitet. Von der Oberfläche des Agar, auf dem sich eine homogene Cultur von Milzbrandbacillen entwickelt hatte, wurde mit der Platinnadel ein kleines Häutchen abgenommen und in 10 ^{ccm} physiologischer Kochsalzlösung zerkleinert, so dass eine schwach getrübte Emulsion entstand. Jedem Kaninchen wurden 0.5 einer solchen Emulsion unter die Haut injicirt, und sie blieben sämmtlich nach dieser Infection am Leben, das nicht vaccinirte Controlthier nicht ausgenommen. Nach 6 Tagen wurden die Kaninchen der zweiten Tabelle zum zweiten Mal inficirt, und zwar dieses Mal mit einer grösseren Menge der homogenen Cultur als vorher. Zur Herstellung

Tabelle I.

Kaninchen, welche nach der Injection von Thymusvaccine zu Grunde gegangen sind.

Nr. d. Vers.		Gewicht	Menge der Vaccine	Grad der Wasserverdünnung	Erwärmung	Injection	Tod n. St.	Culturen aus dem Blute der Leiche		
1	Weisses Männchen	1360	30	1 : 2	60°—15 Min.	Am 2. Tage nach d. Sterilisation der Thym.-Cult.	36	Bac. anthr.		
2	Graues, trächtiges Weibchen	1695	30	1 : 3	55°—15 „		6	—		
5	Weisses Männchen	1500	Spuren	1 : 3	100° C. 15 Min.	Am 4. Tage nach der Sterilisation	48	Bac. anthr.		
6	„ „	1330	25	1 : 6			Unmittelbar nach der Sterilisation		50	
7	„ „	1470	Spuren							30
9	„ „	1600	30							8
10	Weisses Weibchen	2410	30	Mischung v. Vacc. einen verschied. Concentration	Nach 5 Tagen wiederholte Sterilisation	Unmittelbar nach der Sterilisation	12	—		
11	„ „	1510	30					12	—	
12	„ „	1214	25					12	—	

Tabelle II.

Kaninchen, welche nach der Injection von Thymusvaccine am Leben geblieben waren, bei der Controlinfection mit Milzbrand aber zu Grunde gingen.

Nr. d. Vers.		Gewicht	Menge d. Vacc.	Grad der Wasserverdünnung	Injection	Zeitraum zwischen der Injection von Thymusvacc. und der ersten Infection	Zwischen der 1. u. d. zweiten Infection	Tod n. Stund.	Kaninchen
3	Graues Weibchen	1430	30	1:3	Am 2. Tag n. Sterilisat. d. Thymuscult.	37	43	36	Im Blute d. zu Grunde gegangenen Kaninch. wurden Milzbrdbac. gef.
4	„ „	1740	30	1:6		11	17	56	
8	Weisses Weibchen	1460	30	1:3	Am 4. Tag	7	13	48	
13	„ „	1222	28	Misch.	Wiederholte Sterilisation	6	12	24	
14	Schwarzes Männch.	1385	20	1:3	Unmittelbar nach der Sterilisation	3	*	48	
15	Graues Weibchen (franz.)	2340	30			3	9	60	
16	Schwarzes Männch. (franz.)	2675	35			2	8	36	
17	Schwarzes Weibch.	1555	30			2	8	30	
—	Weisses Weibchen Controlthier	600	—	—	—	—	—	—	
—	Weisses Männchen Controlthier	945	—	—	—	—	—	—	

* Inficirt mit Blut von der Leiche eines Meerschweinchens.

der Emulsion wurden 10^{cem} physiologischer Kochsalzlösung in zwei Reagensgläschen mit homogener Cultur hineingegossen; es entstand eine trübe Emulsion. Jedem Kaninchen wurde 1^{cem} dieser Emulsion unter die Haut gespritzt. Als Controlthier diente ein weisses Männchen von 945^{gram} Gewicht. Nach dieser Infection gingen alle Kaninchen in 24 bis 56 Stunden an Milzbrand zu Grunde (Culturen!).

Wenn wir auch bei den ersten Versuchen über Vaccination der Kaninchen mit Thymusvaccine erst die Technik der intravenösen Injectionen ausarbeiten mussten, was ihren wesentlichen Mangel ausmacht, so kann man immerhin schon aus den ersten Versuchen einige Fingerzeige entnehmen, die für unsere weiteren Versuche mit Thymusvaccine von Bedeutung sind. Da es auf Grund der Litteraturangaben schwierig war zu bestimmen, bei welcher Temperatur die Thymuscultur ihre Virulenz verliert oder soweit abschwächt, dass sie als Vaccine dienen kann, so war es nothwendig, ein Temperatur-Minimum festzustellen, sowie zu bestimmen, wie lange diese Temperatur auf die Thymuscultur einwirken müsse, damit aus der letzteren wirksame Vaccine entstände.

Zunächst wurde die Einwirkung einer Temperatur unter 100° C. auf die Thymuscultur geprüft. Eine Erwärmung der Thymuscultur bei 55 und 60° C. im Laufe von 15 Minuten — Versuch 1 und 2 — erwies sich als ungenügend zur Abschwächung ihrer Virulenz, und selbst Kochen der Thymuscultur im Verlaufe von 15 Minuten garantirte die Kaninchen nicht immer vor dem Tode, wie die Versuche 5 bis 12 (mit Ausnahme des 8.) zeigten. Am geeignetsten zur Herstellung von Thymusvaccine war ein halbstündiges Kochen der Thymuscultur bei 100° C., wofür die Versuche 14, 15, 16 und 17 sprechen. Wenigstens gehen die Kaninchen nach intravenöser Injection einer solchen Thymusvaccine nicht zu Grunde.

Brieger, Kitasato, Wassermann),¹ sowie auch Fedorow² bereiteten Choleraantitoxin, indem sie eine Thymuscultur von *Spiril. cholerae asiat.* 15 Minuten lang auf 65° C. erwärmten. Was den Milzbrand betrifft, so erwärmten die ersteren drei Autoren, um eine vaccinirende Flüssigkeit zu erhalten, eine in Thymusbouillon verriebene Milz (mit Milzbrandbacillen) 15 Minuten lang auf 70° C.; zum gleichen Zweck kochten sie eine Milzbrand-Thymuscultur während 10 Minuten bei 100° C. Wooldridge erwähnt in seiner Arbeit nicht, wie lange man die Thymuscultur kochen müsse, um daraus Vaccine zu erhalten. Toussaint³ erwärmte das Blut an Milzbrand verstorbenen Thiere 10 Minuten lang auf 55° C. und erhielt eine Vaccine, aber Roux und Chamberland (14)

¹ A. a. O. ² A. a. O. ³ A. a. O.

fanden, dass 10 Minuten zur Abschwächung nicht hinreichen und dass man die Dauer der Erwärmung unbedingt auf 40 Minuten verlängern müsse, damit das Blut seine Virulenz verliere.

Da vielleicht der Grad der Verdünnung der Thymusbouillon mit destillirtem Wasser bei der Immunisirung der Kaninchen von Bedeutung sein könnte, so schenken wir der Concentration der Lösungen des Thymus-extractes unsere Aufmerksamkeit. Doch konnte aus den Versuchen, wo Lösungen verschiedener Concentration gebraucht wurden (1:2, 1:3, 1:5, 1:6), auf einen deutlichen Einfluss dieses Momentes auf den Ausgang der Vaccination kein Schluss gezogen werden.

Weil Wooldridge dem Filter eine wesentliche Rolle bei der Bereitung der Thymusvaccine zuschreibt, so wurde sowohl durch schwedisches Papier, als auch durch Leinwand filtrirt, ohne dass die Filtrate einen wesentlichen Unterschied zeigten.

Das Misslingen der Immunisirung der Kaninchen führte zu der Vermuthung, es könnte der Umstand daran Schuld sein, dass in einigen Fällen die zur Injection fertig gemachte Vaccine einige Tage unbenutzt stehen blieb, wie im 2., 5., 6., 7. und 9. Versuch. Um diesen Einwand zu beseitigen, verwendeten wir in unseren weiteren Versuchen die Vaccine sofort nach ihrer Herstellung; doch wurden dadurch die Resultate, wie wir weiter unten sehen werden, nur wenig beeinflusst.

In den beschriebenen Versuchen wurde die Thymusvaccine entweder durch schwedisches Papier filtrirt, wie in den Versuchen 1 bis 13, oder durch Leinwand durchgelassen (Versuche 14 bis 17), und zwar unmittelbar vor dem Gebrauch. Ein Versuch, die Bereitung der Thymusvaccine so zu modificiren, dass man die dem Thermostat entnommene Thymuscultur, nachdem man sie durchgelassen hat, auf gewöhnliche Weise sterilisirt, und sie dann, ohne sie zum zweiten Mal zu filtriren, den Kaninchen direct in's Blut einführt, misslang, wie folgender Versuch zeigt. Ein Kaninchen, welchem in die Ohrvene 30^{cem} einer nicht filtrirten Thymusvaccine injicirt wurden, gingen 10 Minuten nach der Injection unter den Erscheinungen der Blutgerinnung in den Gefässen zu Grunde; die so bereitete Thymusvaccine enthielt einen flockigen Niederschlag.

Aus den Versuchen der dritten Tabelle ersieht man, dass 12 Kaninchen eine Serie von Thieren bilden, an denen an einem und demselben Tage die Controlinfection mit virulenter Cultur vollzogen wurde. Nach der Zeit der intravenösen Injection kann man die Kaninchen in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden zwei Kaninchen, die Versuche 18 und 19, an welchen die Injection am 31. Januar vollzogen wurde. Zur zweiten

Tabelle III.
Versuche über Schutzimpfung von Kaninchen mit Thymusvaccine.

Nummer des Versuches		Vaccination				G e w i c h t						Infection		
		wann ein- gespritzt	Gewicht	Menge der Vaccine	Grade der Wasserver- dünnung	5./II.	7./II.	13./II.	21./II.	23./II.	24./II.	wie lange nach der Injection	Menge der Emulsion	Tod nach
18	Weisses Weibchen	31./I.	1450	25	1:3	—	—	1445	1470	—	1480	24 Tg.	0.3	78
19	Graues Weibchen	"	1740	30	1:3	—	—	1785	1935	—	1910	24 Tg.	0.5	125
20	Weisses Weibchen	3./II.	1300	25	1:3	1250	1285	1265	1290	—	1325	21 Tg.	0.5	—
21	Weisses Weibchen	"	1270	20	1:3	1215	1275	1315	1395	—	1430	21 Tg.	0.5	—
22	Schwarz-weisses Männch., splenect.	"	1590	30	1:3	1475	1520	1430	1440	—	1450	21 Tg.	0.3	—
23	Weisses Weibchen, Controlthier .	"	1540	30	1:3	1505	1340	1380	1450	—	1320	21 Tg.	0.3	60
24	Schwarz-weisses Männch., splenect.	"	1435	30	1:3	1405	1390	1475	1450	—	1460	21 Tg.	0.3	56
25	Weisses Männchen, Controlthier .	"	1475	30	1:3	1465	1490	1590	1600	—	1605	21 "	0.3	—
26	Schwarzes Weibchen, splenect. .	"	1375	30	1:3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
27	Weisses Weibchen, Controlthier .	"	1410	30	1:3	1255	1285	1380	1375	—	1420	21 "	0.5	100
28	Weisses Männchen	20./II.	1170	30	1:1	(Thymus-Bouill.)	1200	1270	1260	—	1260	4 "	0.5	—
29	Weisses Weibchen	"	1220	30	1:1	—	—	—	1170	1200	1220	4 "	0.5	78
30	Schwarzes Weibchen	"	1140	30	1:3	—	—	—	1160	1170	1170	4 "	0.5	78
31	Weisses Männchen	"	980	30	1:2	—	—	—	940	900	—	—	—	—
32	Schwarzes Weibchen	"	1280	30	1:2	(Thymus-Bouill.)	1235	1200	—	—	—	—	—	—
33	Weisses Weibchen	"	1200	30	1:3	—	—	—	1120	—	—	—	—	—
—	Weisses Männchen, Controlthier .	"	—	—	—	—	—	—	—	—	1680	—	0.5	—

Gruppe gehören 7 Kaninchen, Versuche 20 bis 27, am 3. Februar injicirt. Die dritte Gruppe besteht aus 3 Kaninchen, denen am 20. Februar injicirt wurde, Versuch 28 bis 30. Somit fand die Controlinfection der Kaninchen der ersten Gruppe 24 Tage nach der Infection statt, der zweiten nach 21 und der dritten Gruppe nach 4 Tagen.

Das Material, welches zur Infection für die Kaninchen gedient hatte, war fast in allen Versuchen der dritten Tabelle das gleiche. Zur Controlinfection wurde eine Emulsion benutzt, welche auf die gewöhnliche Weise aus homogener Cultur bereitet war.

8 Kaninchen der dritten Tabelle wurde 0.5 der Emulsion unter die Haut gespritzt, und 4 Kaninchen, von denen 2 splenectomirt waren (Versuch 22 und 24) erhielten nur 0.3 derselben Emulsion. Das Controlkaninchen, welches 0.5 der Emulsion bekommen hatte, blieb am Leben, während von 12 Kaninchen, die mit Vaccine geimpft waren, 7 an Milzbrand zu Grunde gingen. Von den umgekommenen Kaninchen hatten 5 je 0.5 der Emulsion bekommen, 2 je 0.3.

Es blieben also am Leben: das Controlkaninchen, 3 vaccinirte Kaninchen, welche 0.5 der Emulsion erhalten hatten, und 2 gleichfalls vaccinirte, welchen 0.3 der Emulsion injicirt wurde, darunter ein splenectomirtes Kaninchen.

Die Versuche der dritten Tabelle zeigen, dass die intravenöse Injection von Thymusvaccine die Immunität der Kaninchen gegen Milzbrand eher schwächt als steigert.

Betrachten wir alle Versuche der zweiten und dritten Tabelle zusammen, so sehen wir, dass die Controlinfection der Kaninchen in folgenden Zwischenräumen nach der Injection von Thymusvaccine stattfand:

In 3 Versuchen (28, 29, 30)		nach 4 Tagen,
„ 2 „ (16, 17)	:	„ 8 „
„ 2 „ (14, 15)		„ 9 „
„ 1 Versuch (13)		„ 12 „
„ 1 „ (8)		„ 13 „
„ 1 „ (4)		„ 17 „
„ 7 Versuchen (20, 21, 22, 23, 24, 25, 27)		„ 21 „
„ 2 „ (18, 19)		„ 24 „
„ 1 Versuch (3)		„ 54 „

Obleich verschiedene Zeiträume zwischen der Injection der Thymusvaccine und der Controlinfection der Kaninchen lagen, so war das Resultat der Schutzimpfung doch ein gleichmässig ungünstiges, denn der grösste Theil der Kaninchen ging nach der Infection zu Grunde, und nur einige blieben am Leben. Der Tod der vaccinirten Thiere ist nur schwer durch

eine allzu grosse Menge des eingeführten Infectionsmaterials zu erklären. Bezüglich der ersten Versuche, welche die zweite Tabelle bilden, könnte allenfalls noch solch eine Annahme geltend gemacht werden, da in dieser Versuchsserie alle 8 Kaninchen, welchen Thymusvaccine injicirt worden war, sammt den beiden Controlkaninchen, sämmtlich ohne Ausnahme nach der Infection an Milzbrand zu Grunde gingen. Jedoch die Versuche der dritten Tabelle sprechen gegen eine solche Annahme, weil hier von 13 inficirten Kaninchen 5 am Leben blieben, darunter das Controlkaninchen und ein splenectomirtes. Das Resultat der letzteren Versuche bringt zu der Annahme, dass bei der Milzbrandinfection der Kaninchen die Individualität derselben von einer gewissen Bedeutung sein kann.

In den ersten 33 Versuchen wurde solche Thymusvaccine benutzt, welche aus Thymusbouillon gewonnen war, die schon einige Monate vor Beginn der Versuche bereitet worden war; die Thymusbouillon war im October 1893 hergestellt, während die Vaccinationsversuche im Januar und Februar 1894 ausgeführt wurden. Für die weiteren Versuche wurde Anfangs März 1894 frische Thymusbouillon hergestellt, und zwar mit einigen Abänderungen.

Aus 6 frisch getödteten Kälbern wurden die Thymusdrüsen entnommen, gereinigt und fein gehackt. Es resultirten 500^{grm} Drüsenmasse. Dazu wurden 500^{ccm} destillirten Wassers und 2.5^{ccm} Chloroform hinzugegan. Die Mischung wurde auf 18 Stunden in die Kühlkammer gestellt. Nach 12 Stunden wurden noch 500^{ccm} destillirten Wassers hinzugefügt. Der Inhalt des Gefässes wurde von Zeit zu Zeit aufgeschüttelt. Nachdem derselbe durch Leinwand hindurchfiltrirt worden war, resultirten 500^{ccm} eines rosafarbenen, opalescirenden Extractes von schwach saurer Reaction. Zur Neutralisation von 10^{ccm} des Extractes waren 0.1^{ccm} einer normalen Aetznatronlösung erforderlich, von welcher zur ganzen Menge des Extractes 5^{ccm}, und ausserdem nach der Neutralisation noch 2.5^{ccm} hinzugegan wurden. Die letztere Ziffer drückt somit den Alkalescentzgrad des Extractes aus. Nach dem Kochen bildete sich in der Flüssigkeit ein geringer Niederschlag, welcher mittels Filtration durch ein Kupfersieb entfernt wurde. Die Thymusbouillon wurde in kleine Kolben vertheilt, zu je 150^{ccm} und abermals durchgekocht. Es entstand eine dichte, dunkelbräunliche Flüssigkeit, in welcher ein Tropfen Acidum aceticum glaciale einen voluminösen flockigen Niederschlag erzeugte, welcher sich im Ueberschuss des Reactivs wieder auflöste.

Bei den weiteren Versuchen wurde ausschliesslich dicke Thymusbouillon gebraucht, aus welcher die Thymusvaccine ebenso zubereitet wurde, wie das auch schon früher geschah.

In den früheren Versuchen erhielten die Kaninchen zuerst eine intravenöse Injection von Thymusvaccine zum Schutz gegen die nachfolgende künstliche Milzbrandinfection; in unseren weiteren Versuchen waren wir bestrebt, mit Milzbrand inficirte Kaninchen durch intravenöse Injectionen von Thymusvaccine zu heilen. Solche Versuche wurden an 5 Kaninchen angestellt. Die hierzu benutzte Thymusvaccine war auf folgende Weise hergestellt. Thymusbouillon wurde mit homogener Milzbrandcultur inficirt und in den Thermostat gestellt. Nach 2 Tagen wurden 80^{cem} Thymuscultur aus dem Kolben abgegossen, und dieses Quantum 15 Minuten bei 100° C. gekocht — erste Portion. Am nächsten Tage wurde die im Kolben nachgebliebene Thymuscultur auf dieselbe Art sterilisirt — zweite Portion.

Tabelle IV.
Kaninchen, die mit Thymus-Vaccine behandelt wurden.

Nr. d. Vers.	I n f e c t i o n 9./III.						Bemerkungen
		Gewicht in grm	Menge d. Vaccine	Wie lange n. d. Infect. injcirt	Tod nach Stunden	14./III. Gewicht in grm	
34	Schwarzes Männchen	1590	30 ^{cem}	2 Std.	140	—	—
35	Weisses Weibchen	1540	30 „	2 „	—	1630	blieb am Leben
36	Weisses Männchen	1590	40 „	24 „	84	—	Bacillus anthracis
37	Schwarzes Weibchen	1650	28 „	24 „	—	1510	blieb am Leben
38	Weisses Männchen	1600	30 „	24 „	—	1560	„ „ „
	Weisses Männchen (Controlthier)	1930	—	—	105	—	Bacillus anthracis

Die vierte Versuchstabelle zeigt, dass von 5 Kaninchen, welche mit Thymusvaccine behandelt wurden, nur eins an Milzbrand zu Grunde ging, und dass das Controlkaninchen gleichfalls zu Grunde gegangen ist.

Daher wurden angesichts der unbestimmten Resultate der Versuche der Tabelle IV, welche immerhin auf eine günstige Wirkung der Thymusvaccine bei Milzbrandinfection der Kaninchen hoffen liessen, neue Versuche in derselben Richtung angestellt. Es wurden 10 der kräftigsten Kaninchen ausgesucht; die beiden Thiere, welche zur Controle dienten, übertrafen noch die anderen an Gewicht.

Es wurde also 12 Kaninchen je 1.0 einer dreitägigen Cultur von Milzbrandbacillen subcutan injicirt; die Cultur war aus der Leiche des Kaninchens gewonnen, welches im 36. Versuche zu Grunde gegangen war.

Nach der Infection wurde den Kaninchen in die Ohrvene eingeführt: Wasser, Sodalösung, Kochsalzlösung, einfache Bouillon, Thymusbouillon und Thymusvaccine. Vor der Injection wurden alle diese Flüssigkeiten sterilisirt. Die Infection der Kaninchen mit Milzbrand fand zwischen 9 $\frac{1}{2}$ und 10 Uhr Morgens statt, die intravenöse Injection dauerte 3 Stunden, von 10 $\frac{1}{2}$ bis 1 $\frac{1}{2}$ Uhr Nachmittags.

Tabelle V.

Nr. d. Vers.		Gewicht	M e n g e	Tod nach	Bemerkungen
		gram		Stunden	
39	Schwarzes Weibchen	1530	30 ^{ccm} Wasser	40	Bac. anthracis
40	Weisses Weibchen	1580	30 „ Soda	56	„ „
41	Graues Weibchen	2030	30 „ Kochsalz	75	„ „
42	Weisses Männchen	1950	30 „ Bouillon	—	
43	Weisses Weibchen	1530	30 „ Thymusbouill.	20	Bac. anthracis
44	Graues Männchen	2000	30 „ Thymusvacc.	—	
45	Graues Weibchen	2040	30 „ „	80	Bac. anthracis
46	Graues Männchen	1585	25 „ „	48	„ „
47	„ „	1040	25 „ „	52	„ „
48	Graues Weibchen	1490	27 „ „	52	„ „
49	Graues Controlthier	2330		—	
50	Dunkelbr. Männchen (Controlthier)	2130		32	Bac. anthracis

Aus den Versuchen der Tabelle V ersieht man, dass die Injection von Thymusvaccine bei vorher mit Milzbrand infectirten Kaninchen unwirksam ist; alle Kaninchen der fünften Tabelle gingen zu Grunde bis auf drei alte Kaninchen. Die letzten Versuche zeigen, dass den alten Kaninchen eine relativ grössere Unempfänglichkeit gegen Milzbrand eigen ist, auch schon an und für sich, unabhängig von der Schutzimpfung.

Die Einzelheiten der Anordnung der Versuche der Tabelle V bestehen in Folgendem. Für 5 Kaninchen, welchen die Thymusvaccine nach Infection mit Milzbrand injicirt wurde, dienten 7 Kaninchen als Controlthiere; von den letzteren blieben nur 2 ohne Injection, den übrigen wurden mehr oder weniger indifferente Flüssigkeiten eingeführt, um zu bestimmen, welchen Einfluss die obengenannten Flüssigkeiten im Vergleich mit der Thymusvaccine auf die Empfänglichkeit der Kaninchen gegen Milzbrand ausüben können. Auf Grund aller vorhergegangenen Versuche

konnte man annehmen, dass die Thymusvaccine die Kaninchen nicht nur nicht gegen Milzbrand schützt, sondern vielleicht sogar deren natürliche Unempfänglichkeit gegen denselben abschwächt. Die Versuche, den Kaninchen neben Thymusvaccine auch Flüssigkeiten von anderer Zusammensetzung und anderer Herkunft in's Blut zu injiciren, zeigen, dass alle von uns zur Injection genommenen Flüssigkeiten, darunter auch Thymusvaccine, den gleichen Einfluss auf den Ausgang der Milzbrandinfection der Kaninchen ausüben, und dass ein Unterschied zwischen ihnen nicht zu constatiren ist. Bei der Auswahl der Infectionsflüssigkeiten liessen wir uns von folgenden Gesichtspunkten leiten: die physiologische Kochsalzlösung ist am indifferentesten für das Blut; parallel derselben wurde destillirtes Wasser genommen. Zu Gunsten der Sodalösung sprachen die Versuche von Fodor (32), welcher mit Milzbrand inficirte Kaninchen durch subcutane Sodainjectionen heilte; oben wurde erwähnt, dass Woolbridge und Gramatschikow Kaninchen Thymusbouillon einspritzten, um sie vor Milzbrand zu schützen; zum Vergleich mit Thymusbouillon wurde dann noch gewöhnliche, schwach alkalische Bouillon genommen.

Wir sehen, dass zu allererst, 20 Stunden nach der Infection, ein Kaninchen zu Grunde ging, welchem 30^{cem} gewöhnlicher Thymusbouillon in's Blut eingeführt worden waren; darauf, nach 32 Stunden, ein grosses Männchen, eines der beiden Controlkaninchen; nach 40 Stunden verendete ein Kaninchen, welchem Wasser in's Blut eingeführt worden war; nach 48 Stunden das erste der Kaninchen, welche Thymusvaccine erhalten hatten; nach 52 Stunden starben das zweite und dritte Kaninchen, welche Thymusvaccine erhalten hatten; nach 56 Stunden ging das Kaninchen zu Grunde, welches Sodalösung erhalten hatte; nach 75 Stunden dasjenige, welchem Kochsalz injicirt war, und endlich nach 80 Stunden das vierte von den 5 Kaninchen, die Thymusvaccine bekommen hatten. Am Leben blieben 3 Kaninchen, von denen einem Thymusvaccine injicirt worden war, dem zweiten gewöhnliche Bouillon, und von denen das dritte keinerlei Injection erhalten hatte.

Unsere Versuche zeigen also, dass die Injection von Thymusvaccine gleich der Injection anderer, mehr oder weniger indifferenter Flüssigkeiten weder die Kaninchen vor der Milzbrandinfection schützt, noch auch die schon inficirten Kaninchen heilt, und dass andererseits einige Kaninchen gewisse individuelle Besonderheiten besitzen, vermöge deren sie unempfänglich gegen die Infection bleiben, gleichviel, ob ihnen Vaccine injicirt wurde oder nicht. Die oben beschriebenen Versuche geben der Annahme Raum, dass die alten Kaninchen sich im Vergleich mit den jungen durch Unempfänglichkeit auszeichnen.

Tabelle VI.

Nr. des Versuches		Gewicht	Tod nach	Bemerkungen
52 (44)	Graues Männchen	2010 ^{gmm}	70 Std.	} an Milzbrand
53 (49)	Graues Weibchen	2520 „	60 „	
54	Weisses Männchen	1360 „	40 „	
55	„ „	1585 „	52 „	
56	Schwarzes Männchen	1540 „	46 „	
57	Schwarzes Weibch. (trächt.)	1870 „	27 „	
58	Weisses Weibchen	1470 „	27 „	

Die Kaninchen der Tabelle VI wurden mit einer Emulsion inficirt, welche aus homogener Cultur in zwei Probirgläschen bereitet wurde, in welche etwa 8^{cem} einer physiologischen Kochsalzlösung hineingegossen worden war. Jedem Kaninchen wurde 1·0 einer solchen Emulsion unter die Haut gebracht. Zur Infection hatte also eine Emulsion gedient, welche auf gewöhnlichem Wege zubereitet war, und doch blieb kein einziges Kaninchen nach der Infection am Leben, während von den Kaninchen der fünften Tabelle drei am Leben geblieben waren.

Der Unterschied zwischen den Kaninchen der beiden letzten Tabellen besteht in Folgendem. Die ersten 2 Kaninchen der sechsten Tabelle hatten schon früher zu den Versuchen der Tabelle V gedient, wo sie die Milzbrandinfection überstanden hatten, krank gewesen und dann genesen waren. Dessenungeachtet gingen die beiden alten Kaninchen bei erneuter Infection zu Grunde, ebenso wie das alte Kaninchen, welches zum 51. Versuch gedient hatte. Die genannten drei Versuche zeigen, dass eine Milzbranderkrankung, welche Kaninchen früher wohlbehalten überstanden haben, dieselben bei erneuter Infection nicht vor dem Tode schützt; ja umgekehrt, die erste Erkrankung schwächt die Kaninchen und macht sie empfänglicher für eine neue Infection. Was die 5 Controlkaninchen der sechsten Tabelle betrifft, so war eins davon (58. Versuch), ein weisses Weibchen, notorisch jung, die übrigen 4 waren vor Kurzem gekauft und von schlechter Ernährung.

Also zwei entschieden alte Kaninchen waren geschwächt durch die vorausgegangene erste Infection; ein Weibchen, ein noch junges Thier, zeigte gesteigerte Empfänglichkeit für Milzbrand, und 4 Kaninchen, welche sich unter dem Einflusse des Hungers und ungünstiger Lebensbedingungen befanden, konnten von herabgesetzter Widerstandsfähigkeit gegen den Milzbrand sein. Dadurch lässt es sich bis zu einem gewissen Grade erklären, warum alle Kaninchen der sechsten Tabelle ohne Ausnahme nach

der Infection an Milzbrand zu Grunde gingen. Die Versuche der sechsten Tabelle, welche keine directe Beziehung zur Vaccination der Kaninchen besitzen, wurden dazu angestellt, um einige auf die individuelle Unempfänglichkeit der Kaninchen bezügliche Fragen — unabhängig von der Vaccination — klarzustellen.

Wenn wir nun alles im ersten Capitel Dargelegte resümiren, so gelangen wir zu folgendem Schlusse. Alle unsere Immunisirungsversuche an Kaninchen, nach der Methode von Wooldridge, ergaben ein negatives Resultat, ungeachtet dessen, dass die Herstellung der Thymusvaccine und die Vaccination der Kaninchen verschiedentlich variirt wurde. In dieser Hinsicht sind von besonderer Bedeutung die Versuche der fünften Tabelle, für welche die Thymusvaccine nach den in letzter Zeit empfohlenen Regeln zubereitet wurde, wobei all unsere praktische Erfahrung zur Anwendung kam, welche wir aus früheren Versuchen gewonnen hatten. Zum Wasserinfus der Drüse wurde Chloroform hinzugefügt; die Reaction der Thymusbouillon wurde durch Titriren festgestellt; die Thymuscultur wurde 15 Minuten lang gekocht, die Thymusvaccine wurde durch ein Sieb hindurchgelassen, wodurch die Möglichkeit mechanischer Zurückhaltung der wirksamen Elemente der Vaccine ausgeschlossen wurde; die intravenöse Injection von Thymusvaccine und die subcutane Milzbrandinfection der Kaninchen wurden fast gleichzeitig ausgeführt, wie es auch Wooldridge gethan hatte u. s. w. Allein welchen Modificationen die Thymusvaccine und die Vaccination der Kaninchen auch immer unterworfen wurden, das Resultat der Vaccination blieb immer das gleiche: bei der Controlinfection mit Milzbrand gingen die vaccinirten Kaninchen zu Grunde.

Auf Grund einiger Versuche könnte man sogar vermuthen, dass die Thymusvaccine, wenn sie nach der Methode von Wooldridge angewandt wird, die Kaninchen nicht nur nicht vor Infection schützt, sondern sogar ihre Empfänglichkeit für Milzbrand steigert, indem sie den Organismus schwächt. Es ist schwer, a priori anzunehmen, dass 30^{cem} Eiweisssemulsion, unmittelbar in's Blut von Kaninchen eingeführt, für den Organismus ganz ohne Folgen bleiben sollten. Gramatschikow hat in seiner Arbeit darauf hingewiesen, dass die Kaninchen durch die Injection von Thymusbouillon geschwächt werden, und nach derselben an Gewicht verlieren. Es ist anzunehmen, dass der schwächende Einfluss der Thymusvaccine auf die Kaninchen noch grösser sein dürfte.

Somit kommt die Bedeutung der beschriebenen Vaccinationsversuche an Kaninchen mit Thymusvaccine im Wesentlichen darauf hinaus, dass die Milzbrandinfection an nicht nur nicht immunisirten, sondern vielmehr

durch die intravenöse Flüssigkeitsinjection geschwächten Kaninchen ausgeführt wurde.

Es bleibt noch unerklärt, weshalb in den einen Fällen von Milzbrandinfection die Kaninchen am Leben blieben, in den anderen an derselben Infection zu Grunde gingen. Nicht immer findet sich eine befriedigende Erklärung für diejenigen Fälle, wo einzelne Kaninchen am Leben blieben, während die Mehrzahl der anderen Kaninchen, welche sich unter den gleichen Versuchsbedingungen befunden hatten, an Milzbrand zu Grunde ging. Auf Grund der Infectionsversuche kann man nur sagen, dass die Kaninchen gewisse individuelle Besonderheiten besitzen, denen zu Folge sie sich so oder so zur Infection verhalten; man kann aber nicht immer bestimmen, warum in einigen Fällen diese Besonderheiten einen gewissen Einfluss auf den Ausgang der Infection besitzen, während in anderen Fällen dieser Einfluss aufgehoben wird. In Ermangelung positiver That-sachen können wir nur vermuthungsweise auf diese Besonderheiten hindeuten.

Die Klarlegung der ursächlichen Abhängigkeit zwischen den individuellen Besonderheiten der Kaninchen und dem betreffenden Verhalten der letzteren zur Milzbrandinfection wird erschwert durch die Complicirtheit der zu erörternden Frage. So kann man z. B. auf Grund der Versuche glauben, dass das Alter der Kaninchen von Bedeutung sei für den Grad ihrer Unempfänglichkeit gegen Milzbrand, doch ist es schwer, diese Bedeutung mit der erforderlichen Genauigkeit nachzuweisen, vor Allem aus Mangel an entsprechendem Versuchsmaterial. Sind Experimente an alten Thieren erforderlich, so müssen auch unzweifelhafte Beweise dafür vorhanden sein, dass die betreffenden Individuen wirklich alt sind. Da man jedoch nach dem Aussehen der Kaninchen nur schwer auf ihr Alter schliessen kann, so sind genaue Daten über die Zeit ihrer Geburt erforderlich. Dazu müsste man zweckmässiger Weise so verfahren, wie es K. Müller gethan hat, welcher sich zu seinen Versuchen an Ratten der Nachkommenschaft bediente, welche von einem einzigen Paar im Laufe mehrerer Jahre entsprossen war. Bei solchen Versuchsbedingungen ist es möglich, mit Genauigkeit das Alter der Thiere zu kennen. Das käufliche Material zu benutzen ist riskirt.

In unserer Arbeit ist darauf hingewiesen worden, dass Czaplewski, als er von der Unempfänglichkeit der Tauben gegen Milzbrand spricht, dem Alter der Thiere Bedeutung beimisst. Der genannte Autor findet es bedauerlich, dass bei der Beschreibung der Versuche nicht immer das Alter der Tauben angegeben wird, und bemerkt, dass auf die Angaben der Händler über das Alter der Tauben kein Verlass sei. Es finden sich

auch noch andere Angaben in der Litteratur,¹ welche dafür sprechen, dass junge Thiere empfänglicher gegen Milzbrand sind, als alte. Die Unempfänglichkeit der alten Kaninchen ist nur eine relative, denn bei wiederholter Milzbrandinfection können alte Kaninchen ebenso leicht zu Grunde gehen, wie alle anderen.

Aus den Versuchen über Milzbrandinfection von Kaninchen kann man den Schluss ziehen, dass, wenn die Kaninchen nach experimenteller Infection an Milzbrand erkrankt und genesen sind, sie deshalb bei erneuter Infection nicht nur nicht gegen den Tod geschützt sind, sondern eher einen Theil ihrer Unempfänglichkeit gegen Milzbrand eingebüsst haben.

Es wäre von Wichtigkeit, das individuelle Verhalten der Kaninchen zur Milzbrandinfection klarzustellen, um eine sicherere Handhabe zur Beurtheilung der Infectionsversuche an immunisirten Kaninchen zu besitzen. Versuche in dieser Richtung sind schon von einigen Autoren gemacht worden. So fand K. Müller, welcher die Frage von der Unempfänglichkeit der Ratten gegen Milzbrand untersuchte, dass die weissen Ratten empfänglicher sind, als die mit dunklem Fell. Es wäre von Interesse, den Grad der individuellen Unempfänglichkeit der Kaninchen gegen Milzbrand bei derselben Versuchsanordnung klarzustellen, wie sie der genannte Autor bei seinen Versuchen an Ratten benutzte. Dann würden wir vielleicht mehr Handhaben gewinnen, um die ungleichartigen Ausgänge der Milzbrandinfection der Kaninchen zu erklären. Wenn einzelne Culturen als zu schwach angesehen werden, andere als äusserst virulent, und dazwischen noch eine grosse Zahl von Uebergangsstufen der Virulenz angenommen wird, wenn man ferner zur Infection „homogene Culturen“ benutzen zu müssen glaubt, so wäre es consequent, auch bei der Auswahl der Thiere das Princip der Homogenität anzuwenden. Unter solchen Bedingungen könnten die Versuche der Immunisirung und der Controlinfection von Kaninchen, deren individuelle Verschiedenheiten genügend berücksichtigt werden, Resultate von grösserer Genauigkeit ergeben.

¹ Einige Materialien zur Frage von der relativen Unempfänglichkeit alter Thiere gegen Milzbrand finden sich in der Arbeit von K. Müller (a. a. O. S. 226, 228, 232); ebenso haben auch andere Autoren auf den Einfluss des Alters hingewiesen, z. B. Roger (a. a. O. S. 536).

Zweiter Abschnitt.

Versuche mit Pasteur'scher Vaccine.

Im Beginn unserer Arbeit, bei der Uebersicht der Methoden zur Milzbrandschutzimpfung von Kaninchen kamen wir zu dem Schlusse, dass die Methode von Roux und Chamberland, die sich durch Originalität auszeichnet, besondere Beachtung verdient, daher uns auch eine Wiederholung der Versuche nach der genannten Methode besonders wünschenswerth erschien. Ehe wir nun an die Beschreibung unserer Versuche über Vaccination der Kaninchen mit Pasteur'scher Vaccine gehen, wollen wir uns genauer mit der Arbeit von Roux und Chamberland bekannt machen, worin die Autoren ihre Ansicht über die Vaccinationsmethoden an Kaninchen niederlegen.

Aus der genannten Arbeit ist ersichtlich, dass Roux und Chamberland die überzeugtesten Anhänger Pasteurs bezüglich der Schutzimpfung von Thieren gegen Milzbrand sind; ihrer Angabe nach sind Kaninchen und Meerschweinchen nicht so leicht zu immunisiren, wie Ochsen und Schafe. Nach den Beobachtungen der Autoren ruft die erste Vaccine, Kaninchen und Meerschweinchen unter die Haut gespritzt, bei denselben keinerlei Reaction hervor, weder locale (Oedem), noch allgemeine (Temperaturerhöhung). Die zweite Vaccine dagegen tödtet alle Meerschweinchen ohne Ausnahme, und den dritten Theil der Kaninchen, die sie eingespritzt erhalten. Diejenigen Kaninchen aber, welche nach Einführung der zweiten Vaccine am Leben bleiben, werden unempfindlich gegen den Milzbrand. Nach Inoculation der zweiten Vaccine entsteht bei den Kaninchen bisweilen ein ausgedehntes Oedem, und am 2. oder 3. Tage nach der Infection steigt die Temperatur. Der krankhafte Zustand, welcher durch die zweite Vaccine hervorgerufen ist, dauert zuweilen 5 bis 7 Tage, wobei die Temperatur 4 bis 5 Tage lang erhöht bleibt. Dann fällt die Temperatur, und gleichzeitig fängt das Infiltrat an, sich zu resorbiren. Wenn man Kaninchen mit der ersten Vaccine in der Weise impft, wie man das bei Schafen macht, so erweist sich zwar die Inoculation der zweiten Vaccine für sie in solchem Falle als weniger verderblich, doch gehen immerhin einige der gimpften Kaninchen an der zweiten Vaccine ebenso leicht zu Grunde, wie Kaninchen, welchen die erste Vaccine nicht eingespritzt worden war. Die überaus grosse Empfänglichkeit der Kaninchen für Milzbrand ist nach Ansicht der Autoren die Ursache, weshalb es so schwer ist, die Kaninchen mittels der gewöhnlichen Schutzimpfungsmethode unempfindlich zu machen, welche bei Schafen so gute Resultate giebt. Deshalb schlug Feltz folgende Methode zur Immunisirung der Kaninchen vor. Ausser den gewöhnlichen Vaccinen erster und zweiter Stärke werden

noch dazwischen liegende Vaccinen von drei allmählich sich steigernden Stärkegraden angefertigt, so dass eine Reihe abgeschwächter Vaccinen von verschiedener Virulenz entsteht: 1. erste Vaccine, 2. Vaccine, die etwas stärker ist als die erste Vaccine, 3. Vaccine, welche zwischen der ersten und zweiten Vaccine in der Mitte steht, 4. Vaccine, welche sich der zweiten Vaccine nähert, doch etwas schwächer ist als diese, und endlich 5. die zweite Vaccine; oder wenn man nach dem Verweilen der Vaccine im Thermostat rechnet, so werden 24-, 21-, 18-, 15- und 12tägige abgeschwächte Culturen angefertigt. Wenn alle aufgezählten Vaccinen gut hergestellt sind, so kann man bei deren Benutzung gute Resultate mit der Immunisirung von Kaninchen erzielen, wie die Versuche gezeigt haben, welche noch im Pasteur'schen Laboratorium begonnen wurden.

Roux und Chamberland fanden die Herstellung einer so grossen Zahl von Vaccinen zu complicirt und schwierig, und arbeiteten ihre eigene Methode aus, welche bekanntlich in Folgendem besteht. In die Ohrvene der Kaninchen werden 40^{cem} der ersten Vaccine injicirt; solch eine Injection ruft bei ihnen keinerlei Störung hervor. Am 2. oder 3. Tage wird die intravenöse Injection wiederholt; eine Woche später werden 0.25 der zweiten Vaccine unter die Haut gespritzt. Nach der Injection der zweiten Vaccine steigt die Temperatur ein wenig, und die Kaninchen werden völlig immun gegen Milzbrand.

Wir wollen nun zusehen, inwieweit unsere Immunisirungsversuche an Kaninchen nach der Methode von Roux und Chamberland die oben angeführten Befunde dieser Autoren bestätigen (s. Tabelle VII S. 266).

Von den Versuchen der Tabelle VII sind die Versuche 1, 3 und 6 auszuschliessen, da sie nur zu dem Zweck vorgenommen wurden, um die Culturen auf ihren Abschwächungsgrad zu prüfen. Diese Versuche zeigten, dass bei einer zweiten Abschwächung der Culturen eine 24tägige und sogar eine 35tägige Cultur zu stark sind für die erste Vaccine, und nur eine 40tägige Cultur als solche Vaccine gelten kann. Alle Kaninchen in den übrigen Versuchen gingen entweder an der ersten, oder an der zweiten Vaccine zu Grunde, oder an der Probeinfection mit virulenter Cultur; man kann daher die Kaninchen der siebenten Tabelle in drei Gruppen eintheilen.

Die erste Gruppe bilden die Kaninchen des 12. und 13. Versuches, welche nach der intravenösen Injection der ersten Vaccine zu Grunde gegangen sind. Im 12. Versuche waren einem schwarzen Weibchen von mittlerem Gewicht in die Ohrvene 25^{cem} der ersten Vaccine, bzw. einer 40tägigen abgeschwächten Cultur eingespritzt worden; das nach der Injection gesunkene Gewicht des Kaninchens erreichte bald wieder seine

Tabelle VII.

Nr. des Versuches	Versuchsthier	Wann injicirt	Gewicht	Menge der Vaccine		Wie lange abgeschwächt	Gewicht			16./III.		23./III.		24./III.		2./IV.		7./V.		T o d nach Stunden
				ccm	Stück.		6./III.	7./III.	14./III.	Gewicht	ccm	1. Vacc.	Gewicht	ccm	2. Vacc.	Gewicht	ccm	1. Vacc.	Gewicht	
1	Weisses Männchen	3./II.	1320	22	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	56 (B. anthr.)
2	Schwarzes Männchen	6./II.	1720	22	12	1010	—	—	1255	1270	30	1235	1-0	—	—	—	—	—	135	"
3	Graues Männchen	13./II.	1550	25	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	36	"
4	"	"	1900	16	30	1900-1-0 ¹	—	—	1930	—	—	—	—	1900	30	1800	0-3	1810	0-5	72
5	Weisses Weibchen	"	1920	22	35	1980-1-0 ¹	—	—	2060	—	—	—	—	2070	30	2180	0-3	2240	0-5	90
6	Weisses Männchen	19./II.	1190	30	35	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	90	"
7	Schwarzes Männchen	"	1630	30	40	1630-1-0 ¹	—	—	1640	1595	30	1655	1-0	—	—	—	—	—	56	"
8	Schwarzes (französ.) Männchen	25./II.	2560	40	40	—	—	2675	2730	2690	30	2560	1-0	—	—	—	—	2570	0-5	75
9	Weisses Männchen	"	2090	30	40	—	—	2045	2160	2130	30	2115	1-0	—	—	—	—	1970	0-5	72
10	Graues Männchen	"	1760	25	40	—	—	1745	1780	1690	30	1795	1-0	—	—	—	—	—	100	"
11	Weisses Weibchen	"	810	15	40	—	—	800	870	900	20	965	0-2	—	—	—	—	—	56	"
12	Schwarzes Weibchen	"	1700	25	40	—	—	1690	1700	—	—	—	—	1730	30	—	—	—	12	"
13	Weisses Weibchen	"	770	15	30	—	—	800	830	850	—	—	—	940	20	—	—	—	11 Tagen	"
14	Graues (französ.) Weibchen	6./III.	2670	40	40	—	—	—	2400	—	—	—	—	2360	18	2500	0-3	2480	0-5	60 (B. anthr.)
15	Weisses Weibchen	24./III.	1430	30	24	—	—	—	—	Vgl. 20. Vers. auf Tab. VIII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"
16	Schwarzes spleneect. Graues Männchen (Nr. 31) (Controlthier)	25./II.	1440	25	40	—	—	1420	1480	1460	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"
	Graues Weibchen (Controlthier)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"
	1 2. Vaccine.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"

ursprüngliche Höhe, ja es überstieg dieselbe sogar. Als jedoch einen Monat nach der ersten intravenösen Injection dem Kaninchen wieder 30^{cem} der ersten Vaccine in's Blut eingeführt wurden, da ging das Thier 12 Stunden nach der Injection zu Grunde. Im 13. Versuche, welcher ganz analog dem 12. angeordnet war, wurden einem jungen weissen Weibchen, dessen Gewicht nur die Hälfte des vorigen betrug, in die Ohrvene zum ersten Mal 15^{cem} und zum zweiten Mal 20^{cem} der ersten Vaccine injicirt; das Kaninchen magerte ab und starb.

Vergleichen wir den 12. und 13. Versuch, so sehen wir, dass das erste Kaninchen 12 Stunden, das zweite 11 Tage nach der zweiten Injection zu Grunde ging, und dass die Culturen aus dem Blute beider Leichen negative Resultate ergaben. Im ersten Falle kann man eine acute Intoxication annehmen, worauf die bei der Obduction des Kaninchens gefundenen Blutaustritte in das Zellgewebe und in die inneren Organe hinweisen. Im zweiten Falle ging das Kaninchen an der im Anschluss an die Injection zur Entwicklung gekommenen Kachexie zu Grunde, welche an eine chronische Vergiftung erinnert.

Es muss bemerkt werden, dass nicht alle Kaninchen auf die Injection der ersten Vaccine so reagirten, wie die Kaninchen des 12. und 13. Versuches. Obgleich der 12. Versuch an dem gleichen Tage (25./II.) mit drei anderen Versuchen (8., 9. und 10.) angestellt wurde, so ging das Kaninchen des 12. Versuches zu Grunde, während die drei anderen am Leben blieben, obwohl ihnen zum ersten Mal nicht weniger als 25^{cem} in's Blut eingeführt wurde, und zum zweiten Mal, fast einen Monat nach der ersten intravenösen Injection (16./III.) 30^{cem} der ersten Vaccine. Es ist jedoch zu beachten, dass die zweite intravenöse Injection erster Vaccine am ersten Kaninchen (12. Versuch) gesondert von den drei letzten ausgeführt wurde, und zwar eine Woche später, am 24./III., wobei dem ersten Kaninchen 30^{cem} in die Ohrvene injicirt wurden von einer Vaccine aus einem anderen Kolben, aus welchem gleichzeitig die Kaninchen des 12., 4. und 5. Versuches Einspritzungen erhielten. Wie gesagt, ging das Kaninchen des 12. Versuches zu Grunde, während die Thiere vom 4. und 5. Versuche am Leben blieben.

Somit besitzen wir bei der ersten intravenösen Injection für das Kaninchen des 12. Versuches Controlthiere in den Kaninchen des 8., 9. und 10. Versuches, für die zweite Injection in den Kaninchen des 4. und 5. Versuches. Alle diese Versuche zeigen, dass die erste Vaccine, welche den genannten Kaninchen injicirt wurde, für dieselben nicht zu virulent war, und dass der Tod des Kaninchens vom 12. Versuche nach Injection der ersten Vaccine durch individuelle Besonderheiten dieses Kaninchens zu erklären ist.

Die gleiche Erklärung gilt auch für den Ausgang des Vaccinationsversuches Nr. 13, für welchen der 11. als Controlversuch dient. In beiden Versuchen wurde jungem Weibchen von fast gleichem Gewicht in die Ohrvene die gleiche Menge erster Vaccine injicirt, welche demselben Kolben entnommen war, und als dann die erste Vaccine zum zweiten Mal injicirt wurde, blieb, wie bekannt, das eine Kaninchen (Versuch 11) am Leben, während das andere (Versuch 13) zu Grunde ging.

Von den Kaninchen der Tabelle VII erlebten die beiden geschilderten gar nicht die Injection der zweiten Vaccine, sondern gingen schon nach der intravenösen Einführung der ersten Vaccine zu Grunde, während vier andere Kaninchen (Versuche 2, 7, 10 und 11) zwar die Injection der ersten Vaccine überstanden, aber dafür nach subcutaner Injection der zweiten Vaccine zu Grunde gingen.

Die Einzelheiten dieser 4 Versuche, welche die zweite Gruppe der 7. Tabelle bilden, sind folgende. Zunächst ist zu bemerken, dass in allen diesen Versuchen die erste intravenöse Injection am 25./II. gemacht wurde, die zweite erst am 16./III., d. i. $2\frac{1}{2}$ Wochen nach der ersten, und die Einspritzung der zweiten Vaccine am 23./III., eine Woche nach der zweiten intravenösen Injection. Roux und Chamberland aber empfehlen, die erste Vaccine zwei Mal, mit einer Zwischenzeit von 2 bis 3 Tagen zu injiciren, die zweite Vaccine aber eine Woche nach der zweiten intravenösen Injection der ersten Vaccine einzuspritzen.

Aus dem oben Gesagten ist ersichtlich, dass unsere Versuche der ersten Bedingung der Vaccinationsversuche nicht nachkommen, der zweiten dagegen wohl. Der Grund für eine solche Versuchsanordnung wird später erörtert werden.

Von den 4 Kaninchen der zweiten Versuchsgruppe wurde zweien (10. und 11. Versuch) die erste Vaccine genau in derselben Weise injicirt, wie auch zweien anderen Kaninchen derselben Tabelle, welche aber zur dritten Versuchsgruppe gehören (Versuche 8 und 9); die Kaninchen der beiden letzteren Versuche besaßen ein grösseres Gewicht als die der ersteren zwei, und erhielten deshalb etwas mehr von der ersten Vaccine; trotzdem vertrugen sie eine subcutane Injection von 1.0 der zweiten Vaccine, während von den beiden ersten Kaninchen das eine, grössere, (Versuch 10) nach 1.0 der zweiten Vaccine zu Grunde ging, während das andere, kleinere (Versuch 11), nach 0.2 dieser Vaccine starb. Diese Versuche zeigen, dass die dazu benutzten Kaninchen in ihrem Verhalten zur Vaccination individuelle Verschiedenheiten äusserten.

Die beiden anderen Versuche der zweiten Gruppe (2. und 7. Versuch) weichen noch mehr von der Regel ab, welche Roux und Chamberland zur Immunisirung von Kaninchen aufgestellt haben. Im zweiten Versuche

wurden dem Kaninchen zum ersten Mal 22^{cem} der zweiten Vaccine in die Ohrvene injicirt, bzw. einer 12 tägigen abgeschwächten Cultur, welche durch schwedisches Papier hindurchfiltrirt war, und nach 1½ Monaten wurde eine zweite intravenöse Injection vorgenommen, wobei 30^{cem} der ersten Vaccine eingespritzt wurden, welche in den Versuchen 7, 8, 9, 10 und 11 zur zweiten intravenösen Injection gedient hatte. Eine Woche nach der zweiten Injection wurde dem Kaninchen 1.0 der zweiten Vaccine unter die Haut gespritzt, wonach das Thier zu Grunde ging, während die Kaninchen des 8. und 9. Versuches, welche gleichfalls 1.0 der zweiten Vaccine erhalten hatten, am Leben blieben.

Der letzte Versuch (Versuch 7) der zweiten Gruppe ist anders angeordnet als alle vorhergehenden, denn in demselben gingen wir von dem von Roux und Chamberland empfohlenen Vaccinationsmodus ab. Das Kaninchen erhielt 2 Wochen nach der ersten intravenösen Injection erster Vaccine eine subcutane Einspritzung von 1.0 zweiter Vaccine; eine Woche später wurde abermals eine intravenöse Injection der ersten Vaccine gemacht, welche zur zweiten intravenösen Injection in den Versuchen 8, 9, 10 und 11 gedient hatte; und endlich fand eine Woche nach der zweiten Injection erster Vaccine eine abermalige subcutane Injection zweiter Vaccine statt, welche den Tod an Milzbrand zur Folge hatte.

Da alle vier Kaninchen der zweiten Versuchsgruppe nach Einspritzung von 1.0 der zweiten Vaccine zu Grunde gingen, so konnte man annehmen, dass die dazu benutzte Vaccine nicht genügend abgeschwächt war, allein gegen eine solche Annahme spricht einerseits der Umstand, dass von drei Kaninchen (Versuch 4, 5 und 7), welche mit derselben Vaccine am 7./III. inficirt worden waren, zwei am Leben blieben; und andererseits, dass von vier Kaninchen (Versuch 7, 8, 9 und 10), welchen die zweite Vaccine am 24./III. eingespritzt wurde, ebenfalls zwei am Leben blieben. Es bleibt die Annahme übrig, dass die grössere Sterblichkeit der Kaninchen durch die zweite Vaccine von der in unseren Versuchen stattgehabten Abweichung abhängt, welche darin bestand, dass anstatt eines ¼^{cem}, wie es Roux und Chamberland empfehlen, unseren Kaninchen ein ganzer Cubikcentimeter der zweiten Vaccine unter die Haut gespritzt wurde.

Wir sehen also, dass unsere oben geschilderten Versuche von den nach der Roux-Chamberland'schen Methode ausgeführten darin abweichen, dass erstens die erste Vaccine den Kaninchen in geringerer Menge in's Blut eingespritzt wurde, nämlich meist nur 25 bis 30, statt 40^{cem}; zweitens, dass von einer intravenösen Injection bis zur anderen statt 2 bis 3 Tage oft einige Wochen vergingen, und drittens, dass die Menge der eingespritzten zweiten Vaccine viermal so gross war wie die

von den Autoren empfohlene. Die genannten Abweichungen, die theils in einer Herabsetzung der Quantität des immunisirenden Materials bestanden, theils in einer Verlängerung des Zeitraums zwischen den einzelnen Injectionen, aus denen sich die Roux-Chamberland'sche Immunisirungsmethode zusammensetzt, geschahen aus Vorsicht, da allen uns bekannten Immunisirungsmethoden die allmähliche Gewöhnung des Organismus mittels kleiner Dosen an das Ueberstehen der Infection mit stärkerem Gift zu Grunde liegt.

Trotz der geschilderten Abweichungen blieben dennoch die 5 Kaninchen der dritten Gruppe bis zur Controlinfection mit virulenten Culturen am Leben (Versuch 4, 5, 8, 9 und 14). Der 8. und 9. Versuch sind bereits zusammen mit den Versuchen der zweiten Gruppe besprochen, und zwei andere Versuche (4 und 5) reihen sich dem 7. Versuch an, welcher ebenfalls bei der Beschreibung der vorhergehenden Versuche Erwähnung fand. Der 4., 5. und 14. Versuch bieten gleichfalls Abweichungen von dem Vaccinationsmodus dar, wie er von Roux und Chamberland vorgeschlagen wurde.

Dem Kaninchen des 4. Versuches wurden zum ersten Mal 16^{cem} einer 30 tägigen abgeschwächten Cultur in's Blut eingeführt, welche durch Leinwand filtrirt war; einen Monat nach der ersten intravenösen Injection wurde 1·0 der zweiten Vaccine subcutan eingespritzt; 2½ Wochen nach der Einspritzung zweiter Vaccine fand abermals eine intravenöse Injection von 30^{cem} der ersten Vaccine statt, und abermals nach einer Woche eine zweite subcutane Einspritzung von 0·3 der zweiten Vaccine.

Der 5. Versuch war analog dem 4. angeordnet, nur mit dem Unterschiede, dass dem Kaninchen des 5. Versuches zum ersten Mal 22^{cem} einer 35 tägigen abgeschwächten Cultur in die Ohrvene injicirt wurden. Beim 14. Versuche waren wir bestrebt, uns genau an die Vorschrift der Vaccination zu halten, wie sie Roux und Chamberland gegeben haben; als jedoch einem grauen Weibchen französischer Race 40^{cem} der ersten Vaccine in's Blut eingeführt wurde, so verlor dasselbe nach der Injection bedeutend an Gewicht, so dass die zweite intravenöse Injection auf einige Zeit aufgeschoben werden musste. Es wurden daher 3 Wochen nach der ersten intravenösen Injection nicht 40, sondern nur 18^{cem} der ersten Vaccine in die Ohrvene des Kaninchens eingespritzt.

Die 5 Kaninchen der 3. Versuchsgruppe wurden mit homogener Cultur inficirt, welche auf gewöhnlichem Wege bereitet war. Zur Controle wurden zwei Kaninchen genommen, von denen eines früher zum 51. Versuche der 6. Tabelle gedient hatte; das andere Controlkaninchen war ein gesundes Weibchen, 1860^{grm} schwer. Alle 7 Kaninchen, denen 0·5 einer

Emulsion aus homogener Cultur subcutan injicirt wurde, gingen 60 bis 90 Stunden nach der Infection an Milzbrand zu Grunde (Culturen).¹

Wir sehen also, dass unsere ersten Versuche über Immunisirung von Kaninchen mit Pasteur'scher Vaccine, wie sie in der 7. Versuchstabelle enthalten sind, den Tod sämtlicher Kaninchen zur Folge hatten, sei es an der Schutzimpfung, sei es an der Controlinfection mit virulenter Cultur.

Da der Erfolg der Immunisirung zweifellos von der Güte der Vaccine abhängt, so wollen wir einmal zusehen, welche Eigenschaften die Vaccine besass, welche zu den Versuchen der Tabelle VII benutzt wurde. Zur ersten intravenösen Injection wurde vorzugsweise unsere 40 tägige abgeschwächte Cultur von Milzbrandbacillen benutzt, welche in ihrem Verhalten gegen weisse Mäuse der 24 tägigen Pasteur'schen oder der sogenannten ersten Vaccine entsprach. Die Abschwächungsdauer der Culturen kann nicht von Bedeutung sein, wenn nur die Vaccine ihre spezifische Wirkung auf weisse Mäuse und Meerschweinchen besitzt, von denen bekanntlich die ersteren durch die erste Vaccine zu Grunde gehen, die letzteren hingegen trotz derselben am Leben bleiben müssen.

Unsere 40 tägige abgeschwächte Cultur genügte den an die erste Vaccine zu stellenden Forderungen, denn sie war zweifellos eine Reincultur von Milzbrandbacillen, was durch Thierimpfungen, Controlzüchtungen auf Nährmedien und durch mikroskopische Untersuchung nachgewiesen wurde; dabei war die Virulenz unserer ersten Vaccine in genügendem Maasse abgeschwächt. Die Vaccine war nicht zu stark, sonst wäre es schwer zu verstehen, dass die Kaninchen die intravenöse Injection von Quantitäten bis zu 40 ^{cem} vertragen; doch war sie auch nicht zu schwach, denn alle Mäuse, welchen 0.1 einer solchen Vaccine unter die Haut gespritzt wurde, gingen ausnahmslos an Milzbrand zu Grunde.

Da die Grenze der Virulenz der ersten Vaccine zwischen der Empfänglichkeit der Maus und der Unempfänglichkeit des Meerschweinchens in der Mitte gelegen ist, die Kaninchen aber fast absolut unempfänglich gegen dieselbe sein müssen, so müsste man der Controle halber die erste Vaccine jedesmal ausser der Maus auch noch dem Meerschweinchen injiciren. In einigen Fällen jedoch begnügten wir uns damit, mit der ersten Vaccine, welche wir aus altem, schon früher an Mäusen und Meerschweinchen erprobtem Impfmateriel bereiteten, nur noch an einer Maus eine Controlimpfung vorzunehmen; das Thier ging nach der Einspritzung regelmässig am 2. oder 3. Tage an Milzbrand zu Grunde, was durch Controlculturen auf Gelatine bestätigt wurde. Wenn die Kaninchen eine

¹ Vom 15. Versuche der Tabelle VII wird bei der Besprechung der folgenden Versuchsserie die Rede sein, welche die Tabelle VIII bildet.

intravenöse Injection von 30 bis 40 ^{cem} der ersten Vaccine überstehen, so kann man auch ohne Controlinfection von Meerschweinchen auskommen; würden dagegen die Kaninchen nach der intravenösen Injection der ersten Vaccine an Milzbrand zu Grunde gehen, so müsste auch die Wirkung der ersten Vaccine auf Meerschweinchen bestimmt werden. Es ist noch zu bemerken, dass die Lebensfähigkeit der Bacillen der ersten Vaccine in unseren Versuchen mittels Durchführung der Vaccine durch eine Maus aufrecht erhalten wurde, und dass wir ausserdem den Fall benutzten, wo ein junges Meerschweinchen 11 Tage nach Einspritzung von 1.0 der ersten Vaccine an Milzbrand verendete, um aus seinem Blute eine neue Generation von Bacillen abgeschwächter Cultur zu erlangen; allein diese Vaccine unterschied sich, wie die Versuche zeigten, nicht wesentlich von unserer 40 tägigen abgeschwächten Cultur, weder der einfachen, noch der durch eine Maus hindurchgeleiteten.

Man kann somit auf Grund der angeführten Thatsachen annehmen, dass unsere erste Vaccine in ihren morphologischen und biologischen Eigenschaften der sog. ersten Vaccine Pasteur's entsprach, worauf auch die weiteren Versuche hindeuten (s. Tabelle VIII S. 273).

Zu den Versuchen, welche in der Tabelle VIII enthalten sind, dienten 11 Thiere, welche grössere Unterschiede von einander aufweisen, als sie bei den Kaninchen der vorgehenden Tabelle vorhanden waren. Von den 10 Kaninchen (8. Tabelle) waren die 3 ersten (Versuch 17, 18 und 19) einige Monate vor der Immunisirung splenectomirt, die übrigen 7 hatten schon früher zu Immunisirungsversuchen gedient: 6 Kaninchen mit Thymusvaccine und 1 mit erster Vaccine.

Die Einzelheiten der vorhergegangenen Versuche an den letzten 7 Kaninchen bestehen in Folgendem. Wie aus der Tabelle VII ersichtlich ist, waren dem Kaninchen, welches zum 15. Versuche gedient hatte, am 24./III. 30 ^{cem} erster Vaccine dritter Zubereitung injicirt worden. Dasselbe Kaninchen wurde, wie unter Versuch 20 der 8. Tabelle beschrieben ist, vom 5./IV. an abermals immunisirt, sodass es drei intravenöse Injectionen erster Vaccine erhielt.

Drei Kaninchen (Versuche 21, 22 und 24 der 8. Tabelle) hatten früher zum 31., 32. und 25. Versuche der Tabelle III gedient (vgl. den 1. Abschnitt). Wie bekannt, wurden den beiden ersten am 20./II. 30 ^{cem} sterilisirter Thymusbouillon in's Blut eingeführt, wonach ihr Gewicht sich gar nicht veränderte; dem letzten Kaninchen wurde ausser der intravenösen Injection von Thymusvaccine noch eine subcutane Einspritzung von 0.3 einer Emulsion gemacht, die aus einer Cultur bereitet war, wonach die Mehrzahl der gleichzeitig mit ihm inficirten Kaninchen an

Tabelle VIII.

Nr. des Versuches	5./IV.		9./IV.		15./IV.		22./IV.		4./V.		10./V.		20./V.	
	Gewicht	1. Vacc.	Gewicht	1. Vacc.	Gewicht	2. Vacc.	Gewicht	1. Vacc.	Gewicht	1. Vacc.	Gewicht	1. Vacc.	Gewicht	Homolog. Cultur
17 Weisses Weibchen	1810	30	1630	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18 Weisses trächtiges Weibchen	1540	30	1570	25	1680	0·25	—	—	—	—	—	—	—	—
19 Schwarz-weisses Männchen	1535	30	1475	30	1500	0·25	1475	—	—	—	1470	40	—	—
20 Weisses Weibchen	1485	35	1360	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21 Weisses Männchen	1150	30	1185	30	1190	0·25	—	—	—	—	—	—	—	—
22 Schwarzes Männchen	1240	35	1230	30	1260	0·25	—	—	—	—	—	—	—	—
23 Weisses Weibchen	1570	35	1530	30	1610	0·25	—	—	—	—	—	—	—	—
24 Weisses Männchen	1600	35	1510	35	1290	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25 Schwarzes Weibchen	1620	35	1540	35	1440	0·25	1485	1620	40	1475	—	—	1570	0·5
26 Weisses Männchen	1500	18	1420	30	1460	0·25	1485	1420	40	1430	—	—	1215	0·5
27 Hase	4035	50	3900	50	3925	0·4	—	—	—	—	—	—	—	—

Milzbrand zu Grunde ging. Das Gewicht des letzten Kaninchens nahm nach Infection mit der Emulsion noch mehr zu.

Die übrigen 3 Kaninchen, Versuch 23, 25 und 26, hatten zu den Versuchen 35, 37 und 38 der Tabelle IV gedient und gleichzeitig sowohl eine subcutane Injection von 1·0 der aus homogener Cultur bereiteten Emulsion als auch eine intravenöse Injection von Thymus-Vaccine bekommen, wonach nur ein Kaninchen, welches hernach zum 26. Versuch der Tabelle VIII benutzt wurde, 100^{grm} an Gewicht verlor, die übrigen gar nicht abnahmen und völlig gesund aussahen.

Ausser den genannten 10 Kaninchen wurde zum 11. Versuch ein Hase genommen, welcher weit schwerer war als selbst die französischen Kaninchen.

Somit wurde die Gruppe von Thieren, welche die 8. Versuchstabelle ausmachen und recht verschiedenartig zusammengesetzt sind, gleichartigen Vaccinationsversuchen unterzogen. Hierzu wurde die erste Vaccine in 2 Kolben bereitet, und zwar in titrirter Bouillon, deren Alcalescenz 1^{cem} normaler Aetznatronlösung auf 100^{cem} Bouillon gleichkam. In einem Kolben wurde die Bouillon mit 40 tägiger abgeschwächter Cultur unserer zweiten Zubereitung inficirt (Agarcultur), im zweiten Kolben wurde die Bouillon mit ebensolcher 40 tägiger abgeschwächter Cultur geimpft, welche durch ein Meerschweinchen hindurchpassirt war.

Nach 6 Tagen wurden die Culturen aus dem Thermostat genommen, durch ein Metallsieb gelassen und den Kaninchen injicirt. Zur Controle wurde einer grauen Maus 0·2 der Cultur aus dem ersten Kolben unter die Haut gespritzt, einer anderen grauen Maus die gleiche Menge aus dem zweiten Kolben, wonach beide Mäuse am 3. Tage nach der Infection zu Grunde gingen, und zwar an Milzbrand (Culturen). Die nach der geschilderten Methode hergestellte erste Vaccine wurde zur ersten intravenösen Injection für die Thiere der Tabelle VIII benutzt, zur zweiten Injection dagegen, welche 4 Tage nach der ersten stattfand, diente eine Vaccine, welche ebenfalls in titrirter Bouillon bereitet wurde, in zwei Kolben, welche 4 Tage im Thermostat standen. Zur Prüfung der ersten Vaccine, welche zur zweiten Injection diente, wurde einer grauen Maus 0·2 der Vaccine aus einem Kolben injicirt, einer weissen Maus eben so viel aus dem anderen Kolben, wobei die Mäuse 36 Stunden nach der Infection an Milzbrand zu Grunde gingen (Culturen).

Die zweite Vaccine, welche den Thieren der Tabelle VIII unter die Haut gespritzt wurde, stellte eine 3 tägige Bouilloncultur vor, welche mit einer 12 täglichen abgeschwächten Cultur unserer 3. Zubereitung geimpft war.¹

¹ Bekanntlich wird zur Prüfung des Virulenzgrades der zweiten Vaccine das Kriterium angegeben, dass eine richtig hergestellte zweite Vaccine, mit welcher

Die 11 Versuche der Tabelle VIII stehen den nach der Roux-Chamberland'schen Methode ausgeführten Versuchen näher, als die der Tabelle VII, denn da wurden die einzelnen Vaccineinjectionen genau in derselben Reihenfolge und in denselben Zeiträumen gemacht, wie es die genannten Autoren angeben. Aber da die französischen Kaninchen schwerer sind, als die russischen, so wurde die erste Vaccine in unseren Versuchen in relativ geringerer Menge injicirt, so dass die Kaninchen der Tabelle VIII statt 40^{cem} nur 35 bis 18^{cem} der Vaccine bekamen, meistentheils 30^{cem}; dem Hasen, der ein erheblich grösseres Gewicht besass, wurden 50^{cem} in's Blut einverleibt. Für die Zweckmässigkeit der Verminderung des Quantums erster Vaccine sprach auch der Umstand, dass nach unseren Beobachtungen fast alle Kaninchen auch nach intravenöser Injection der verminderten Menge erster Vaccine an Gewicht abnahmen.

Bei dieser Anordnung der Immunisirungsversuche an Kaninchen mit Pasteur'scher Vaccine gingen von 11 Thieren (Tabelle VIII) 3 Kaninchen (Versuch 17, 20 und 24) nach Injection der ersten Vaccine zu Grunde (erste Gruppe), 5 Thiere (Versuche 18, 21, 22, 23 und 27) verendeten nach Injection der zweiten Vaccine (zweite Gruppe), und nur 3 Kaninchen (Versuche 19, 25 und 26) blieben nach der Milzbrand-Schutzimpfung am Leben (dritte Gruppe).

Erste Gruppe von Kaninchen. Von den Kaninchen der ersten Gruppe erwies sich ein splenectomirtes Weibchen als trächtig und gebar während der zweiten intravenösen Injection lebendige Junge. Den Ausgang der Vaccination kann man in diesem Falle dadurch erklären, dass die Schwangerschaft und vorzeitige Geburt eine gesteigerte Empfänglichkeit des Weibchens für die erste Vaccine bedingten, was den Tod des Kaninchens zur Folge hatte. Aber auch ohne die Complication mit Schwangerschaft gingen Kaninchen der Tabelle VIII nach intravenöser Injection der ersten Vaccine zu Grunde, wie im 20. Versuche aus der ersten Gruppe, wo dem Weibchen nach einander 30, 35 und 30^{cem} erster Vaccine einverleibt worden war; das Thier ging am 4. Tage nach der 3. Injection an Milzbrand zu Grunde (Culturen!); wir ersehen daraus, dass man nicht immer ungestraft den Kaninchen grosse Mengen von Milzbrandculturen in's Blut eingiessen kann, auch wenn die Cultur bis zum Grade der ersten Vaccine abgeschwächt ist, und dass bei gewissen Versuchsbedingungen die Kaninchen auch nach der ersten Vaccine zu Grunde gehen. Derartige Versuche sprechen gegen die Methode der Milzbrand-Schutzimpfung durch häufige Injectionen von grossen Mengen abgeschwächter Culturen, welche

Kaninchen ohne vorausgängige Injection erster Vaccine geimpft werden, ungefähr den dritten Theil der inoculirten Kaninchen tödtet.

die Widerstandsfähigkeit des Organismus gegen die Infection nicht nur nicht steigern, sondern vielmehr herabsetzen, indem sie den Organismus schwächen. Zur Bestätigung des Gesagten kann man auch noch den letzten Versuch der ersten Gruppe (24. Versuch der Tabelle VIII) anführen, in welchem ein mittelschweres Kaninchen nach der ersten intravenösen Injection von 35 ^{cem} erster Vaccine abzumagern begann, und als ihm 4 Tage nach der ersten Injection abermals 35 ^{cem} der ersten Vaccine einverleibt wurden, allmählich schwächer wurde und 6 Tage nach der zweiten Injection an Milzbrand starb (Culturen). Der beschriebene Versuch zeigt, dass für gewöhnliche, mittelschwere Kaninchen 30 bis 35 ^{cem} der ersten Vaccine eine zu grosse Dosis sind.

Zweite Gruppe der Kaninchen. Die zweite Gruppe, welche aus 5 Thieren besteht (Versuch 18, 21, 22, 23 und 24), ist die grösste der drei Versuchsgruppen der Tabelle VIII. Die zweite Vaccine wurde, wie gesagt, 8 Thieren eingespritzt, von denen nach der Injection nur die 3 Kaninchen am Leben blieben, welche die dritte Gruppe bilden, die übrigen 5 Thiere gingen an der zweiten Vaccine zu Grunde. Diese Thatsachen beweisen, dass unsere zweite Vaccine nicht absolut tödtlich war für Kaninchen, denen vorher die erste Vaccine zwei Mal in's Blut eingespritzt war. Bei der Einspritzung der zweiten Vaccine in der zweiten Gruppe hätten zur Controle einige Kaninchen genommen werden müssen, denen keine intravenöse Injection erster Vaccine vorher gemacht worden war, doch war das nicht geschehen, weil an die Möglichkeit, die Schutzimpfung mit Pasteur'scher Vaccine könnte negative Resultate ergeben, nicht gedacht worden war. Die Gravidität zweier Weibchen (Versuch 18 und 23) konnte als schwächendes Moment von Einfluss auf den Ausgang ihrer Vaccination sein. Zieht man ferner das geringe Gewicht zweier anderen Kaninchen der zweiten Gruppe in Betracht (Versuch 21 und 22), so kann man annehmen, dass sie entweder zu jung waren, oder wegen angeborener Schwäche erhöhte Empfänglichkeit gegen Milzbrand bewiesen. Um so überraschender ist der Tod eines relativ so grossen Thieres, wie der Hase, welcher verhältnissmässig wenig von der zweiten Vaccine bekam. Dieser Versuch steht vereinzelt da, weil es nicht möglich war, weitere Parallelversuche an Hasen zu machen, denn solche waren zur Zeit unserer Versuche im Handel nicht zu haben. Es erübrigt nur die Annahme, dass das Leben in der Gefangenschaft die natürliche Unempfindlichkeit wild lebender Thiere gegen Milzbrand herabsetzt.

Dritte Gruppe der Kaninchen. Von den 11 Thieren der 8. Versuchstabelle erlebten nur 3 Kaninchen die Probeinfection mit virulenter Cultur (Versuch 19, 25 und 26).

Das erste, ein splenectomirtes Männchen (Versuch 19), vertrug die Präventivimpfung nach Roux-Chamberland'scher Methode, während zwei andere splenectomirte Weibchen zu Grunde gingen: das eine, wie wir sahen, nach Injection der ersten Vaccine (17. Versuch der ersten Gruppe, das andere nach Einspritzung der zweiten Vaccine (18. Versuch der zweiten Gruppe; es wurde oben erwähnt, dass die Gravidität der beiden letzteren Kaninchen eine Complication bei ihrer Immunisirung darstellte. Zwar unterlag das splenectomirte Männchen, welches alle Pasteur'schen Vaccinen gut vertragen hatte, ebenso der Probeinfection mit homogener Cultur, wie zwei andere Kaninchen (25. und 26. Versuch), welche ihre Milz besaßen und gleich dem ersten Kaninchen die Vaccination nach Roux-Chamberland vertragen hatten, allein dieses Kaninchen wurde keiner Controlinfection mit virulenter Cultur unterzogen, weil das anfängliche Ziel dieses Versuches nur darin bestand, zu erfahren, wie sich splenectomirte Kaninchen zu den Pasteur'schen Vaccinen verhalten. Die übrigen zwei Kaninchen der dritten Gruppe (25. und 26. Versuch) wurden mit homogener Cultur von Milzbrandbacillen inficirt, und eines davon, ein weisses Männchen (Versuch 26), ging nach der Probeinfection zu Grunde, wobei zu bemerken ist, dass ausser den zwei genannten Kaninchen noch 13 andere mit homogener Cultur inficirt wurden, von denen noch weiterhin berichtet werden wird, und dass von dieser Serie von Thieren nach der Infection mehr als zehn am Leben blieben, so dass man das zur Infection benutzte Material wohl nicht als zu stark für die Kaninchen ansehen darf. Unter den Kaninchen, welche nach der Probeinfection am Leben blieben, war auch das schwarze Weibchen vom 25. Versuch.

Die letzten zwei Versuche der dritten Gruppe der Tabelle VIII (Versuch 25 und 26) verdienen eine besonders genaue Beschreibung. Bekanntlich hatten diese Kaninchen zuerst zu Immunisirungsversuchen mit Thy-mus-Vaccine gedient und wurden dort als 37. und 38. Versuch der Tabelle IV beschrieben. Aus dem ersten Abschnitt unserer Arbeit ist ersichtlich, dass die genannten beiden Kaninchen zu den dreien gehörten, welche am Leben blieben von den sechs zur 4. Versuchstabelle gehörigen Kaninchen, die mit homogener Cultur inficirt worden waren. Von den drei Kaninchen, welche die Infection überstanden hatten, fand das dritte, ein weisses Weibchen (35. Versuch der Tabelle IV) ebenfalls in die Tabelle VIII Aufnahme und zwar in die zweite Gruppe (23. Versuch), wo es zu den Kaninchen gehört, welche nach Injection der zweiten Vaccine zu Grunde gingen, wahrscheinlich wegen der Complication mit Gravidität. Die Letztere konnte die Widerstandsfähigkeit des Weibchens gegen die zweite Vaccine beeinträchtigen, wenn auch gegen eine solche Annahme der Umstand spricht, dass bei einer späteren Infection von Kaninchen mit ho-

mogener Cultur, am 20. V. ein schwarzes trächtiges Weibchen, von gleichem Gewicht mit dem weissen Weibchen, am Leben blieb; hier spielte vielleicht die Farbe der Haare eine Rolle, denn bekanntlich sind die Albinos schwächer als andere Thiere (Erdt, Heusinger, Kreutzer u. A. Vgl. K. Müller [47]).

Wir sehen somit, dass drei Kaninchen der Tabelle IV, welche hernach in die achte übergingen, irgend welche individuelle Besonderheiten aufwiesen, welche sie befähigten, einer Infection zu widerstehen, welche für drei andere Kaninchen sich als tödtlich erwies. Das Angeführte zeigt uns, wie vorsichtig man sein muss in seinen Schlussfolgerungen aus den Versuchen über künstliche Immunisirung, wenn, abgesehen von der Vaccine schon von Seiten der Thiere selbst zahlreiche individuelle Besonderheiten vorliegen.

Das Gewicht allein ist noch kein genügendes Kriterium für die Besonderheiten im Verhalten der Kaninchen gegen die Vaccination und Milzbrandinfection, worauf die Versuche derselben Tabelle IV hinweisen. Bei denselben dienten Kaninchen von annähernd gleichem Gewicht; die Procedures, denen sie unterzogen wurden, waren auch die gleichen, und dennoch — wenn wir das Schicksal der Thiere verfolgen, so ergibt sich Folgendes: Die Hälfte der sechs Kaninchen der Tabelle IV ging nach der ersten Infection mit homogener Cultur zu Grunde (34., 36. Versuch und Controlversuch). Das Gewicht der übrigen drei Kaninchen änderte sich wenig; ein trächtiges Weibchen, welches weitere intravenöse Injectionen erster Vaccine erhielt, nahm sogar an Gewicht zu, ging aber trotzdem nach Einspritzung der zweiten Vaccine zu Grunde. Man ersieht daraus, dass das Gewicht gravider Weibchen nur relative Bedeutung besitzt, denn dasselbe Weibchen, wenn es nicht trächtig gewesen wäre, hätte an Gewicht verlieren können. Wenigstens begann ein anderes, schwarzes Weibchen, bei derselben Versuchsanordnung schnell abzumagern, so dass es bis zur Injection zweiter Vaccine 200 g^{mm} an Gewicht verloren hatte, und überstand dieses Weibchen nachher sogar die Probeinfection mit homogener Cultur; das letzte der drei Kaninchen endlich, ein Männchen, magerte ebenso ab, wie das soeben genannte Weibchen, aber die Abmagerung ging hier immer weiter, und das Thier verendete an Milzbrand.

Zum Schluss ist zu bemerken, dass alle elf Versuche der Tabelle VIII zu gleicher Zeit und mit der gleichen Vaccine ausgeführt wurden, d. h. unter solchen Bedingungen, wo jeglicher Einfluss der Vaccine im Sinne einer Verschiedenheit ihrer Präparate ausgeschlossen war; das gab uns die Möglichkeit, deutlicher die individuellen Eigenschaften der Kaninchen darzuthun. Gleichwohl kommen die Ausgänge der Versuche der Tabelle VIII auf eins heraus, nämlich den Tod sämmtlicher Kaninchen bis auf

eines — entweder während der Schutzimpfung, oder nachher bei der Controlinfection der immunisirten Kaninchen mit virulenter Milzbrandcultur.

Tabelle IX.

Nr. des Versuches	11./IV.		15./IV.		22./IV.		4./IV.	5./V.	6./V.	10./V.	20./V.	T o d nach
	Gewicht ccm	1. Vacc.	Gewicht ccm	1. Vacc.	Gewicht ccm	2. Vacc.	Gewicht			homogene Emulsion		
28 Graues Weibchen	1510	35	1415	30	1440	0·3	1420	1450	1385	(trächt.)	6 Tag. (B.anthr.)	
29 Weisses Männch.	1570	35	1530	30	1495	0·3	1480	1470	1470	1090	0·5	7 Tagen
30 „ „	1670	32	1610	30	1535	0·3	1515	1550	1520	—	10	„
31 Weisses Weibch.	1710	35	—	—	—	—	—	—	—	(trächt.)	36 Std. (B.anthr.)	
32 „ „	1280	30	—	—	—	—	—	—	—	—	36	„ „
33 Graues Weibchen	1160	22	1105	30	1080	—	—	—	—	—	2	Wochen

Die folgenden sechs Versuche bilden eine neue Serie von Versuchen, welche den vorhergehenden analog sind und nur geringe Abweichungen bieten, von denen weiter unten die Rede sein wird. Die dazu benutzte erste Vaccine wurde folgendermassen bereitet. Die Bouillon, wie gewöhnlich titirt, mit 24 tägiger abgeschwächter Cultur unserer dritten Zubereitung inficirt, stand sechs Tage lang im Thermostat. Eine weisse Maus, welcher 0·2 einer solchen Vaccine unter die Haut gespritzt wurde, starb fünf Tage nach der Inoculation an Milzbrand; eine junge weisse Ratte von der Grösse einer erwachsenen Maus blieb nach Infection mit 0·4 einer solchen Vaccine am Leben. Die so bereitete erste Vaccine wurde zur ersten intravenösen Injection bei den Kaninchen der folgenden, Tabelle IX; zur zweiten intravenösen Injection, welche dieselben Kaninchen vier Tage nach der ersten erhielten, diente die gleiche erste Vaccine unserer dritten Zubereitung, bezw. eine 24 tägige abgeschwächte Cultur in titirter Bouillon, welche vier Tage im Thermostat gestanden hatte. Eine weisse Maus, welche subcutan 0·2 der genannten Vaccine erhielt, ging vier Tage nach der Inoculation an Milzbrand zu Grunde (Culturen).

Die Tabelle IX von Versuchen dient als Ergänzung zur vorhergehenden Tabelle VIII. Wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, genügte die erste Vaccine, welche in der 9. Versuchsserie zur Anwendung kam, den Anforderungen, welche an die Pasteur'sche erste Vaccine gestellt werden. Obgleich in den Versuchen der Tabelle IX zur Immunisirung

der Kaninchen eine 24tägige abgeschwächte Cultur unserer dritten Zubereitung benutzt wurde, in den vorhergehenden Versuchen dagegen die erste Vaccine aus unserer 40tägigen abgeschwächten Cultur hergestellt wurde, konnten wir einen besonderen Unterschied in der Wirkung der genannten abgeschwächten Culturen auf weisse Mäuse und Kaninchen nicht constatiren. Die zweite Vaccine, welche zur subcutanen Injection bei den Kaninchen der Tabelle IX gedient hatte, stammte aus dem Pasteur'schen Institut und unterschied sich auch nicht wesentlich von der gewöhnlichen Pasteur'schen zweiten Vaccine. Genaueres über diese Vaccine folgt weiter unten, bei der Beschreibung der weiteren Versuche, Kaninchen mit Vaccine aus dem Pasteur'schen Institut zu immunisiren.

Von den nach den Roux-Chamberland'schen Methoden ausgeführten Versuchen unterscheiden sich die der Tabelle IX dadurch, dass hier die zweite intravenöse Injection erster Vaccine vier Tage nach der ersten Injection stattfand und nicht zwei oder drei Tage, wie Roux- und Chamberland vorschlagen; zwischen der zweiten intravenösen Injection und der Einspritzung zweiter Vaccine liessen wir statt einer Woche bis zwölf Tage verstreichen; nach der Vaccinemenge, welche zur Immunisirung verbraucht wurde, nähern sich die Versuche der Tabelle IX denen der vorhergehenden Tabelle. Was die Zusammensetzung der Kaninchen der Tabelle IX betrifft, so ist zu bemerken, dass Weibchen darunter waren, von denen sich zwei als trächtig erwiesen, und zwei (Versuch 32 und 33) relativ geringes Gewicht besaßen, was indirect auf ihr jugendliches Alter hinweisen konnte.

Wenn wir alle Kaninchen der Tabelle IX, wie es bisher geschah, in drei Gruppen eintheilen, so bilden die drei letzten Weibchen (Versuch 31, 32 und 33), welche nach intravenöser Injection der ersten Vaccine zu Grunde gegangen sind, die erste Gruppe; das erste und dritte Kaninchen (Versuch 28 und 30), welche nach subcutaner Injection der zweiten Vaccine umkamen, bilden die zweite Gruppe, und zur dritten Gruppe endlich gehört nur ein einziges von den sechs Kaninchen, ein Männchen (Versuch 29), welches die Controlinfection mit homogener Cultur erlebte.

Erste Gruppe von Kaninchen. Die erste Gruppe enthält verhältnissmässig mehr Kaninchen als die beiden anderen Gruppen der Tabelle IX, was früher nicht beobachtet wurde. Abgesehen von der Gravidität des weissen Weibchens, welches zum ersten Versuch der ersten Gruppe gedient hatte, erklärt sich das einerseits durch das geringe Gewicht und wohl auch das jugendliche Alter der beiden letzten Kaninchen dieser Gruppe, andererseits — durch die grosse Menge der in das Blut eingeführten ersten Vaccine. So bekam in den beiden letzten Versuchen

das weisse Weibchen, 1280 ^{grm} schwer, eine relativ grosse Dosis ins Blut injicirt, nämlich 30 ^{ccm} und kam um; das graue Weibchen, 1160 ^{grm} schwer, erhielt bloss 22 ^{ccm} und blieb am Leben. Vielleicht ist die Haarfarbe der Kaninchen in diesem Falle nicht ohne Bedeutung für den Ausgang der Versuche. Doch auch das graue Weibchen konnte eine abermalige Injection von 30 ^{ccm} erster Vaccine, welche vier Tage nach der Injection vorgenommen wurde, nicht überstehen; es magerte allmählich ab und ging nach zwei Wochen unter den Erscheinungen des Marasmus zu Grunde. Die Versuche der ersten Gruppe der Tabelle IX zeigen, dass die intravenöse Injection erster Vaccine für Kaninchen nicht gleichgültig sein kann, ja dass sie dieselben sogar unter gewissen Umständen tödtet.

Zweite Gruppe von Kaninchen. Wie bekannt, gingen von den drei Kaninchen der Tabelle IX (Versuch 28, 29 und 30), welchen die zweite Vaccine injicirt wurde, zwei — ein Männchen und ein Weibchen — (Versuch 28 und 30) nach der Injection an Milzbrand zu Grunde. Die Gravidität des ersten Kaninchens konnte auch in diesem Falle als schwächendes Moment wirken; trotz der Gravidität nahm das Gewicht des Weibchens stetig ab: 1510, 1415, 1440, 1420, 1450, 1385 und 1350 ^{grm}. Nun erhebt sich die Frage, warum von den beiden trächtigen Weibchen der Tabelle IX das eine (Versuch 31) nach der ersten intravenösen Injection erster Vaccine zu Grunde ging, das andere (Versuch 28) erst nach Einspritzung der zweiten Vaccine. Dafür ist folgende Erklärung möglich: Das weisse Weibchen (Versuch 31) befand sich im letzten Stadium der Schwangerschaft, als es die erste intravenöse Injection erhielt (4./IV.). Zu dieser Zeit konnte man noch nicht vermuthen, dass das graue Weibchen (28. Versuch) gleichfalls gravid war. Wahrscheinlich hatte zu dieser Zeit entweder noch gar keine Conception stattgefunden, oder sie fand gerade statt; wenigstens waren die Embryonen, welche einen Monat später (5./V.) bei der Section des grauen Weibchens gefunden wurden, weniger entwickelt als die Embryonen, welche am 13./IV. bei der Section des weissen Weibchens gefunden wurden. Die verschiedenen Stadien der Schwangerschaft, welche nicht weniger als einen Monat auseinander gingen, zusammen mit der verschiedenen Haarfarbe der Kaninchen, konnten für den ungleichartigen Ausgang der Versuche von Bedeutung sein. Ferner ist noch zu erklären, warum das weisse Männchen (30. Versuch der Tabelle IX) ebenso auf die Einspritzung zweiter Vaccine reagierte, wie das gravide graue Weibchen. Man könnte annehmen, dass das graue Weibchen an sich kräftiger war als das Albinomännchen, und dass es dieses überlebt hätte, wenn nicht die Gravidität es bedeutend geschwächt hätte. Aber das Sexualleben ist auch für die Männchen nicht gleichgültig, be-

sonders im Frühling, wo sie einander oft schwere Verletzungen beibringen. Wenn man eine grosse Menge in engem Raum zusammen lebender Kaninchen nicht aufmerksam überwacht, so magern auch ohne alle Versuche viele von ihnen ab und gehen zu Grunde an den von den Rivalen empfangenen Wunden. Oft beginnt ein neues Kaninchen, welches zu den anderen in den Käfig gesetzt wird, an Gewicht zu verlieren, doch man braucht es nur zu isoliren, und es nimmt schnell wieder zu. Oben wurde darauf hingewiesen, dass die Gewichtszahlen an und für sich nur relative Bedeutung haben, wenn man nicht auf die verschiedenen Lebensbedingungen der Thiere Rücksicht nimmt. Bei unseren Versuchen erreichte die Zahl der Kaninchen bisweilen 70 und noch mehr, ohne die anderen Thiere zu zählen, die sich im selben Raume befanden. Da es bei einer so grossen Menge von Kaninchen schwer war, alle Thiere gleichmässig zu beobachten, so kann von oben angedeuteter Seite ein Einfluss auf den Ausgang des 30. Versuches im Vergleich mit dem 28. Versuche nicht ganz ausgeschlossen werden.

Dritte Gruppe von Kaninchen. Der 29. Versuch der Tabelle IX ist der einzige zur Gruppe III zu zählende Versuch, und auch er gehört eigentlich eher zur zweiten Gruppe. Dieses weisse Kaninchen magerte nämlich ganz allmählich ab, ebenso wie das Kaninchen im 30. Versuch. Es ergaben sich folgende Gewichtszahlen: 1570, 1535, 1495, 1480, 1470, 1410 und sogar 1090 ^{g^{mm}}. Die letzte Ziffer bezeichnet das Gewicht am 20./V., als das Kaninchen mit homogener Milzbrandcultur inficirt wurde. Höchstwahrscheinlich wäre dieses Kaninchen auch ohne Infection mit homogener Cultur dem Tode nicht entgangen, zumal es erst eine Woche nach der Infection umkam, nachdem das Gewicht auf 850 ^{g^{mm}} gesunken war, wobei die Culturen aus dem Blute der Leiche ein negatives Resultat ergaben. Bei dem Kaninchen entwickelte sich durch die Vaccine eine Kachexie sui generis, ebenso wie in den Versuchen 28, 30 und 33 der Tabelle IX.

Somit dienen die Versuche der Tabelle IX zur Bestätigung der Schlüsse, welche sich aus den vorhergehenden Versuchen bezüglich der Immunisirungsmethode von Roux und Chamberland ergeben hatten. Sie geben auch an, dass schon die erste Vaccine, in grosser Menge ins Blut injicirt, die Kaninchen eher schwächt als immunisirt, und dass die Menge erster Vaccine, 40 ^{cem}, wie sie Roux und Chamberland empfehlen, für gewöhnliche Kaninchen zu gross ist. Ferner sprechen auch diese Versuche dafür, dass die individuellen Besonderheiten der Kaninchen von grosser Bedeutung für die Erklärung der Mannigfaltigkeit sind, durch welche sich die Ausgänge der Vaccination von Kaninchen auszeichnen.

In den folgenden Versuchen wurde die intravenöse Injection erster Vaccine ebenso, wie in den vorhergehenden, zweimal vollzogen, doch war das Intervall länger als in den früheren Versuchen: es dauerte bis zu neun Tagen. Ausserdem schwankte die Menge der ersten Vaccine in den einzelnen Versuchen von 40 bis zu 5 ^{cem}.

Die erste Vaccine, welche zur ersten intravenösen Injection diente, wurde in titrierter Bouillon bereitet, welche nach der Impfung mit 24tägiger abgeschwächter Cultur (3. Zubereitung) zwei Wochen im Thermostat gestanden hatte. Die weisse Controlmaus, welcher 0.2 der ersten Vaccine von obiger Zubereitung unter die Haut gespritzt wurde, ging am dritten Tage nach der Inoculation an Milzbrand zu Grunde (Culturen). Zur zweiten intravenösen Injection wurde die erste Vaccine in titrierter Bouillon bereitet, welche nach Impfung mit 40tägiger abgeschwächter Cultur unserer zweiten Zubereitung eine Woche im Thermostat gestanden hatte. Eine weisse Maus, welcher 0.2 der so hergestellten ersten Vaccine unter die Haut gespritzt wurde, ging zwei Tage nach der Inoculation an Milzbrand zu Grunde (Culturen).

Mit dem 46. Versuche schliesst die Reihe der Versuche ab, welche unter gleichen Bedingungen von Seiten der Vaccine ausgeführt wurden. Das Material zur ersten intravenösen Injection, die am 25./IV. stattfand, wurde für alle Kaninchen aus einem Kolben genommen. Die zweite Injection wurde am 4./V. mit einer Vaccine gemacht, welche ebenfalls für alle Kaninchen aus einem Kolben genommen wurde. Die zweite Vaccine wurde ebenfalls für alle Kaninchen einem Reagensgläschen entnommen. Die Menge erster Vaccine, welche in die Ohrvene der Kaninchen eingeführt wurde, änderte sich progressiv von 5 bis zu 40 ^{cem}.

Bei der subcutanen Injection der zweiten Vaccine diente als Controlthier ein altes schwarzes Männchen, 1450 ^{grm} schwer, welchem 0.3 zweiter Vaccine aus dem Institut Pasteur unter die Haut gespritzt wurde. 20./V. Gewicht 1485 ^{grm}; subcutan 0.5 homogener Emulsion. 9./VI. Gewicht 1445 ^{grm}; subcutan 1.0 homogener Emulsion. 13./VI. Gewicht 1530 ^{grm}; subcutan 0.2 einer aus Blut bereiteten Emulsion. 16./VI. zum vierten Male eine subcutane Injection von 1.0 homogener Emulsion. 27./VI. fünfte Injection von 1.0 der Emulsion; Gewicht 1515 ^{grm}. Das Kaninchen blieb am Leben.

Die Versuche der Tabelle X unterscheiden sich in ihrem Ausgange von unseren anderen Versuchen, obgleich die zur Anwendung genommene Vaccine sich in keiner Hinsicht von den früheren Vaccinen unterscheidet.

Um den Einfluss der ersten Vaccine auf die Kaninchen klarzulegen, wurde die Menge der injicirten Vaccine allmählich auf 5 ^{cem} herabgesetzt von 40 ^{cem} an (Versuch 34), so dass im 41. Versuch dem Kaninchen nur

Tabelle X.

Nr. des Versuches											26./IV.		26./IV., 27./IV., 28./IV.		4./V.		6./V., 10./V.		12./V.		20./V.		8./VI.		Emulsion aus Blut und Cultur	27./VI.	
	Gewicht	1. Vacc.		Gewicht	Gewicht	1. Vacc.	Gewicht	Gewicht	2. Vacc.	Gewicht	homogene Emulsion	Gewicht	homogene Emulsion	Emulsion aus Blut und Cultur													
		ccm													ccm		ccm		ccm								
34	Schwarzes Männchen	1620	40	1630	1630	1620	1550	30	1550	1585	1560	0.25	1570	0.5	1635	0.8	—	—	—	84 Std. (B. anthr.)							
35	Weisses Weibchen	1430	35	1430	1370	1400	1370	25	1375	1480	1480	0.25	1470	0.5	1720	0.6	—	—	—	—							
36	Graues (französ.) Weibchen	1470	30	1450	1450	1480	1405	25	1400	1415	1550	0.25	1550	0.5	1600	0.8	1.0	—	—	—							
37	Weisses Weibchen	1370	25	1630	1360	1430	1400	30	1400	1515	1560	0.25	1570	0.5	—	—	1.0	—	—	—							
38	Weisses Männchen	1340	20	1260	1250	1250	1230	20	1170	1185	1200	0.25	985	0.5	—	—	—	—	—	5 Tag. (B. anthr.)							
39	Weisses Weibchen	1745	15	1730	1710	1760	1735	15	1720	1725	1700	0.25	1600	0.5	1255	0.1	60	1.0	4	—							
40	Weisses Männchen	1700	10	1650	1640	1640	1660	10	1660	1670	1680	0.25	1595	0.5	Auswaschung des Blutes		7	—	—	—							
41	„	1430	5	1400	1420	1480	1300	5	1320	1325	1300	0.25	1260	0.5	1385	0.5	—	—	—	—							
42	Weisses Weibchen (splenect.)	870	20	850	860	890	860	8	880	935	920	0.3	980	0.2	1075	0.5	—	—	—	—							
43	Weisses Männchen (splenect.)	1105	20	—	—	—	960	—	890	700	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15 Tag. —							
44	Schwarzes (französ.) Weibchen (splenect.)	1315	20	1350	1350	1410	1475	20	1530	1590	1500	0.25	1480	0.5	1750	0.5	—	—	—	—							
45	Weisses Weibchen (splenect.)	1830	40	1780	1770	1820	1620	30	1670	1625	1680	0.25	1260	—	—	—	—	—	—	5 Tag. (B. anthr.)							
46	Weisses Männchen (splenect.)	1045	20	1060	1070	1030	1060	20	1080	1130	1165	0.25	1220	0.5	1235	0.5	—	—	—	—							
	Schwarzes Männchen (Controlhier)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1450	0.3	1485	0.5	1445	1.0	—	—	—	—							
	Weisses Männchen (splen.) (Controlhier)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4 Tag. (B. anthr.)							

5 ^{ccm} ins Blut eingeführt wurden. Dabei wurde zwischen den intravenösen Injectionen eine Pause von 10 Tagen gemacht. Nach der ersten Injection verloren alle Kaninchen an Gewicht. Was die Gewichtsänderung der Thiere betrifft, so hängen die Schwankungen unter Anderem auch von der Nahrungsaufnahme ab. Um zum Vergleich geeignete Resultate zu erzielen, müssen die Wägungen der Kaninchen zu einer bestimmten Tageszeit vorgenommen werden. Ein Gewichtsunterschied von 50 ^{grm} und noch mehr will nicht immer bedeuten, dass das Kaninchen sein Gewicht aus einem anderen Grunde geändert hat als in Folge der Nahrungsaufnahme. Die Wägungen der Kaninchen, welche zu den ersten acht Versuchen gedient hatten, zeigte, dass die Kaninchen zwar an Gewicht verloren, jedoch so wenig, dass man daraus keine Schlüsse ziehen kann.

Die 13 Kaninchen der Tabelle X kann man in zwei Theile eintheilen: der erste Theil enthält acht Kaninchen, welche ihre Milz noch besitzen, der zweite fünf splenectomirte Kaninchen.

Der erste Theil der Kaninchen. Wenn wir die ersten acht Kaninchen in die gewöhnlichen drei Gruppen eintheilen, so finden wir, dass keines der Thiere an der ersten Vaccine zu Grunde ging (erste Gruppe), und auch keines an der zweiten Vaccine (zweite Gruppe), und nur vier Kaninchen verendeten nach der Probeinfection mit virulenten Culturen (dritte Gruppe). Aus der Zahl der zu Grunde gegangenen Kaninchen muss das letzte (Versuch 40) ausgeschlossen werden, weil bei demselben späterhin zu anderen Zwecken eine sogenannte „Durchwaschung des Blutes“ vorgenommen wurde. Bei zwei weiteren Kaninchen entwickelte sich unter dem Einflusse der Vaccination eine Kachexie (Versuche 38 und 39); ihr Gewicht nahm fortwährend progressiv ab, so dass sie wohl auch ohne Controlinfection mit virulenten Culturen zu Grunde gegangen wären.

Es bleibt somit von den vier Kaninchen der dritten Gruppe eines übrig (34. Versuch), welchem die erste Vaccine in grösserer Menge ins Blut gespritzt wurde als den übrigen Kaninchen; zum ersten Mal wurden 40 ^{ccm} injicirt, und zum zweiten 30. Obwohl während dieser Zeit das Thier nur wenig an Gewicht vorlor, so ging es doch, als seine Immunität mit virulenter Cultur geprüft wurde, an Milzbrand zu Grunde. Obgleich die Menge erster Vaccine in diesem Versuch der Roux-Chamberland'schen Regel näher kommt als in allen anderen Versuchen, so endigte dennoch gerade dieser Versuch ungünstig, während die anderen Kaninchen, welche geringere Mengen erster Vaccine erhalten hatten, die Infection unter gleichen Bedingungen überstanden.

Unter den letzten Kaninchen (Versuche 35, 36, 37 und 41) waren zwei gravide Weibchen (Versuch 35 und 37). Dem ersten von ihnen

(Versuch 35) wurden am 25./IV., $1\frac{1}{2}$ Monate vor dem Wurf, 35 ^{cem} erster Vaccine in die Ohrvene injicirt. Zehn Tage später fand abermals eine intravenöse Injection erster Vaccine statt, und zwar 25 ^{cem}. Obgleich nun diesem Weibchen hernach die zweite Vaccine und sogar zweimal virulente Cultur eingespritzt wurde, so gebar es wohlbehalten seine Jungen und säugte dieselben. Auf Grund der früheren Versuche war zu erwarten, dass dieses Weibchen zu Grunde gehen würde, wenn nicht bei der Schutzimpfung, so doch sicherlich bei der Controlinfection. Es blieb jedoch am Leben, ebenso wie auch das andere trächtige Weibchen (Versuch 37), welches während der Controlinfection mit virulenter Cultur wohlbehalten gebar, seine Jungen säugte und nachher noch eine Controlinfection überstand.

Somit gehören die Versuche der ersten Hälfte der Tabelle X zu denen mit günstigerem Ausgange der Vaccination, denn von den acht Kaninchen kamen nur vier um, die anderen vier dagegen erwiesen sich als immun, obgleich die Milzbrandinfection, wie erwähnt, fünf Mal wiederholt wurde.

Der zweite Theil der Kaninchen. Die zweite Hälfte der Kaninchen der Tabelle X bilden fünf splenectomirte Kaninchen, welche genau denselben Operationen unterzogen wurden, wie die acht Kaninchen der ersten Hälfte der Versuche. Die Versuche der zweiten Hälfte unterscheiden sich von denen der ersten darin, dass in dem einen, dem 43. Versuch, das splenectomirte Männchen an der ersten Vaccine zu Grunde ging, in einem anderen, dem 45. Versuch, eben solch ein Männchen nach subcutaner Injection der zweiten Vaccine umkam. Die übrigen drei Kaninchen (Versuche 42, 44 und 46) erwiesen sich als ebenso immun gegen Milzbrand, wie die oben beschriebenen vier Kaninchen der ersten Hälfte der Versuche¹.

Aus den Versuchen der Tabelle X ersehen wir also, dass von 13 Kaninchen sieben sich als immun gegen Milzbrand erwiesen. Doch wäre es wohl kaum gerechtfertigt, diese Immunität dem Einflusse der Vaccination in dem Sinne zuzuschreiben, wie es Roux und Chamberland annehmen. Man könnte dann gar nicht erklären, weshalb früher, bis zum 34. Versuch, die Vaccination gegen Milzbrand nicht gelang; auch spricht die Anordnung der Versuche der genannten Tabelle eher dagegen. Diese Versuche unterscheiden sich — wie wir sahen — von den beschriebenen Roux-Chamberland'schen einerseits durch das grössere Intervall zwischen den Injectionen, andererseits durch die geringe Menge der injicirten ersten Vaccine. In

¹ Einzelheiten über die Vaccination splenectomirter Kaninchen finden sich in meiner Arbeit: „Zur Frage über die Bedeutung der Milz bei Infectiouskrankheiten.“ *Diese Zeitschrift*. 1896. Bd. XXI. S. 466.

den Versuchen der drei vorhergehenden Tabellen wurde die Vaccine den Kaninchen in grösseren Dosen eingespritzt und die Mortalität unter ihnen war bedeutender, folglich spielte die Vaccination die Rolle eines schwächenden Momentes. Und was kann es denn überhaupt für ein Kriterium geben, die Wirksamkeit der Vaccination von Kaninchen nach der Roux-Chamberland'schen Methode zu beurtheilen, wenn wir z. B. aus der Tabelle X ersehen, dass ein gravides Weibchen (35. Versuch), welches in zwei Malen 60 ^{cem} erster Vaccine erhalten hatte, und ein weisses Männchen (Versuch 41), welchem im Ganzen nur 10 ^{cem} dieser Vaccine injicirt worden war, sich als gleich unempfänglich gegen Milzbrand erwiesen? Zu alledem kommt noch, dass das Controlkaninchen, welches, ebenso wie die vaccinirten, einer Probeinfection unterzogen wurde, am Leben blieb. Dabei besass das Material, welches zur Controlinfection der Kaninchen der Tabelle X diente, folgende Eigenschaften:

1. Die erste subcutane Infection der Kaninchen wurde mit homogener Cultur vorgenommen, die auf gewöhnliche Weise bereitet war. Von den 13 mit solcher homogenen Cultur inficirten Kaninchen starben nur zwei — beides weisse Männchen, 29. Versuch der Tabelle IX und 38. Versuch der Tabelle X. Das letztere Kaninchen ging an Milzbrand zu Grunde, was durch Culturen aus dem Blute der Leiche nachgewiesen wurde. Die übrigen elf Kaninchen, darunter auch das Controlthier, ein altes schwarzes Männchen, blieben am Leben.¹

Die homogenen Culturen, welche zur ersten Infection der Kaninchen benutzt wurden, wuchsen üppig auf Glycerin-Agar, sie bedeckten die ganze Oberfläche desselben in weniger als 12 Stunden bei einer Temperatur von 37.5° C.

2. Zweite Probeinfection. Um die Virulenz unserer homogenen Cultur zu prüfen, wurde damit ein Kaninchen inficirt, welches 2½ Tage nach der Infection an Milzbrand zu Grunde ging. Aus dem Blute des umgekommenen Kaninchens wurde eine Reincultur von Milzbrandbacillen isolirt, welche als Material zur Herstellung der homogenen Cultur diente. Mit solchem angefrischem Material wurden die Kaninchen neuerdings, zum zweiten Male, am 9. Juni inficirt. Wie bekannt, ging von neun zum zweiten Mal inficirten Kaninchen nur eines, ein schwarzes Männchen (Versuch 34), an Milzbrand zu Grunde (Culturen).

¹ Auf Grund der vorhergehenden Versuche konnte man vermuthen, dass das zur Controle ausgewählte Kaninchen grössere Widerstandsfähigkeit gegen Milzbrand besitzt; dasselbe sollte darum mit anderen Kaninchen verglichen werden, die durch Vaccination nach Roux-Chamberland'scher Methode geschwächt worden waren.

3. Dritte Infection. Blut aus dem Herzen von der Leiche des letzten Kaninchens wurde vermischt mit sterilisirter Kochsalzlösung (0·6 proc.), so dass eine intensiv roth gefärbte Emulsion entstand. Mit solcher Emulsion wurden sechs Kaninchen zum dritten Mal inficirt, und zwar vier Tage nach der zweiten Infection, und keines starb.

4. Die vierte Infection der Kaninchen ging folgendermassen vor sich. Die auf gewöhnliche Weise bereitete homogene Cultur von Milzbrandbacillen wurde mit dreitägiger Bouilloncultur der Bacillen zu einer dichten Emulsion vermischt. Die mit dieser Emulsion inficirten sieben Kaninchen blieben am Leben.

5. Zur fünften Infection wurde eine Reihe von Controlversuchen in anderer Richtung gemacht. In Anbetracht dessen, dass weisse Ratten von einigen Autoren für ziemlich unempfindlich gegen Milzbrand angesehen werden, begannen wir an weissen Ratten die Virulenz der Culturen zu prüfen. Es erwies sich, dass alle inficirten Ratten unfehlbar an Milzbrand zu Grunde gingen. Es wurden z. B. eine weisse Ratte und ein junges splenectomirtes Kaninchen aus der letzten Serie der operirten Thiere gleichzeitig mit der gleichen Menge der Cultur inficirt. Die Ratte ging nach zwei Tagen an Milzbrand zu Grunde, das Kaninchen erst nach einer Woche. Die fünfte Infection fand also zwei Wochen nach der vierten statt. Zu diesem Behuf wurde die Bouilloncultur von Milzbrandbacillen nacheinander durch drei weisse Ratten hindurchgeleitet. Die letzte Ratte ging zwei Tage nach der Infection zu Grunde. Ihrer Leiche entnommenes Blut wurde mit dreitägiger Bouillon vermischt, welche durch von der zweiten Ratte gewonnene Cultur inficirt war, so dass eine dichte Emulsion entstand. Mit dieser Emulsion wurden zum fünften Male acht Kaninchen inficirt, darunter auch das alte Controlthier.

Als zweites Controlthier wurde ein junges splenectomirtes Kaninchen genommen, 455 g^{mm} schwer, aus der letzten Serie operirter Kaninchen. Nach der Infection gingen von allen Kaninchen an Milzbrand (Culturen) nur zwei zu Grunde: ein weisses Weibchen, welches schon vorher abgenommen hatte, und das splenectomirte Controlkaninchen.

Wir müssen somit constatiren, dass in unseren letzten Versuchen aus unbekannten Gründen die Kaninchen sich als weniger empfänglich für Milzbrand erwiesen als die Kaninchen der vorhergehenden Versuche; keinesfalls aber konnte die Vaccination diese Unempfindlichkeit verursacht haben.

Die folgenden drei Versuche bilden eine kleine Uebergangsgruppe zwischen der Tabelle X und XII. Die Versuche 47, 48 und 49 wurden an jungen Kaninchen angestellt, die zu demselben Nest (Wurf) gehörten, wie die beiden Kaninchen vom 42. und 43. Versuch.

Tabelle XI.

Nr. d. Versuches	Splenect. Kaninchen	4./V.		6./V.	10./V.	14./V.		9./VI.		Tod nach	Gewicht der Leiche	
		Gewicht ccm	1. Vacc.	Gewicht		Gewicht ccm	1. Vacc.	Gewicht	homogene Emulsion			
47	Weisses Weibchen	860	25	835	895	935	20	—	—	18 Std.	880	—
48	Weisses Weibchen	900	25	890	910	900	20	940	0·2	32 „	850	B. anthr.
49	Weisses Weibchen	900	25	890	945	1010	20	—	—	36 „	900	—

Die drei Versuche der Tabelle XI bilden, wie gesagt, ein Bindeglied zwischen der Tabelle X und XII, da beim ersten Male, am 4./V., den Kaninchen dieser Tabelle die erste Vaccine injicirt wurde, welche in den Versuchen der Tabelle X zur zweiten intravenösen Injection gedient hatte, und beim zweiten Mal denselben Kaninchen die erste Vaccine aus dem Institut Pasteur eingespritzt wurde, die den Kaninchen der Tabelle XII ins Blut injicirt worden war.

Nach der zweiten Injection erster Vaccine gingen zwei Kaninchen zu Grunde (Versuch 47 und 49). Als Todesursache kann man die erste Vaccine aus dem Institut Pasteur ansehen, wie das aus den Versuchen der Tabelle XII hervorgehen wird. Subcutane Injection der zweiten Vaccine fand nicht statt, obgleich das eine von den drei Kaninchen (Versuch 48) nach Injection der ersten Vaccine am Leben blieb und der Vaccination mit zweiter Vaccine hätte unterzogen werden müssen. Am 9./VI. wurde das letzte Kaninchen zusammen mit den Kaninchen der Tabelle X mit homogener Cultur inficirt; es ging an Milzbrand zu Grunde (Culturen) ebenso, wie auch ein anderes (34. Versuch der Tabelle X).

Da alle unsere Versuche, Kaninchen zu immunisiren, resultatlos blieben, so war es von Interesse, unsere Vaccine mit denen zu vergleichen, welche im Institut Pasteur hergestellt waren. Die letzteren hatten folgende Eigenschaften. Die erste Vaccine stellte eine gelbliche, durchsichtige Flüssigkeit mit feinpulverigem Niederschlage am Boden des Gläschens vor. Die zweite Vaccine war blasser gefärbt als die erste, und hatte eben solch einen Niederschlag wie diese. Die mikroskopische Unter-

suchung und Cultivirung auf Nährmedien zeigten, dass die genannten Vaccine Reinculturen von Milzbrandbacillen darstellen. Der Grad der Virulenz der Vaccine wurde durch Impfung von weissen Mäusen und Meerschweinchen bestimmt.

Erste Vaccine. 1. Einer weissen Maus wurde am 28./IV. 0·2 der ersten Vaccine unter die Haut gespritzt. Nach 2 Tagen abermals subcutan 0·2 derselben Vaccine. Am nächsten Tage ging die Maus an Milzbrand zu Grunde (Culturen). Aus dem Blute der Leiche wurden auf Glycerin-Agar Reinculturen dargestellt.

2. Gleichzeitig wurde einem Meerschweinchen 1·0 der ersten Vaccine unter die Haut gespritzt, und nach 2 Tagen ebenso viel. Das Meerschweinchen erlag 48 Stunden nach der zweiten Injection an Milzbrand (Culturen).

Zweite Vaccine. 1·0 der zweiten Vaccine wurde einem Meerschweinchen subcutan eingespritzt. Nach 2 Tagen abermalige Injection von 1·0 derselben Vaccine. Das Thier verendete nach 48 Stunden an Milzbrand (Culturen). Aus dem Blut der Leiche wurde eine Reincultur auf Glycerin-Agar dargestellt.

Die erste Vaccine aus dem Institut Pasteur vermochte also unter gewissen Bedingungen ein Meerschweinchen zu tödten, erwies sich somit als stärker als unsere Vaccine, welche nur weisse Mäuse tödtete. Dagegen war die zweite Vaccine aus dem Pasteur'schen Institut für Kaninchen niemals tödtlich, wie die vorhergehenden Versuche zeigten, so dass diese Vaccine schwächer wirkte, als die zweite Vaccine unserer Zubereitung. Aus dem oben Gesagten geht hervor, dass unsere erste Vaccine mehr den an eine erste Vaccine zu stellenden Anforderungen entsprach, als die erste Vaccine aus dem Institut Pasteur.

Angesichts einer solchen Differenz wurden die Versuche mit den Vaccinen auf verschiedene Weise combinirt. In einigen Versuchen wurde nach der ersten Vaccine unserer Zubereitung zweite Vaccine aus dem Institut Pasteur gebraucht. In anderen folgte auf eine Injection unserer ersten Vaccine eine solche von erster Vaccine aus dem Pasteur'schen Institut, und hernach erst wurde zweite Vaccine aus dem Institut Pasteur eingespritzt. Zu der ersten Kategorie gehören die Versuche 28 bis 46, zur zweiten 47 bis 49, und zur dritten die Versuche, welche die Tabelle XII bilden. Die Resultate all dieser Versuche unterscheiden sich wenig von den Resultaten der Immunisirung von Kaninchen mit Vaccine unserer Zubereitung.

Die erste Vaccine, welche den Kaninchen der Tabelle XII injicirt wurde, war folgendermassen bereitet. Titirte Bouillon wurde in zwei

Kolben zu je 500 ^{ccm} vertheilt und mit erster Vaccine inficirt, welche durch eine weisse Maus hindurchpassirt war. Der erste Kolben stand 4 Tage im Thermostat. Am 2. Tage wurde die Buillon trübe, und am 4. bildete sich am Boden des Kolbens ein flockiger Niederschlag, welcher beim Aufschütteln des Kolbeninhaltes zerfiel. In der ersten Vaccine unserer Zubereitung wurde ein so reichlicher Niederschlag niemals beobachtet.

Der zweite Kolben, welcher aus der gleichen Quelle, wie der erste, und gleichzeitig mit demselben inficirt wurde, stand doppelt so lang im Thermostat, also 8 Tage. Es entstand ein voluminöser Niederschlag, welcher sich sogar bei starkem Schütteln des Kolbeninhaltes nur schwer vertheilen liess.

Die zweite Besonderheit bestand darin, dass beide Controlmäuse erst eine Woche nach der Infection mit der ersten Vaccine zu Grunde gingen (0.2 der Vaccine). Trotzdem ersieht man aus der Tabelle XII, dass alle 10 Kaninchen dieser Tabelle kurze Zeit nach intravenöser Injection dieser Vaccine zu Grunde gingen.

Die erste intravenöse Injection mit Vaccine aus dem Kolben wurde am 10./V. gemacht, die zweite aus dem zweiten Kolben 4 Tage später, am 14./V. Die Vaccine in beiden Kolben stellte Reinculturen von Milzbrandbacillen dar, was sowohl durch Züchtung auf Nährmedien, als auch durch mikroskopische Untersuchung constatirt wurde.

Tabelle XII.

Nr. d. Versuches		10./V.		13./V.	14./V.		Tod nach	
		Gewicht	1. Vacc. ccm	Gewicht		1. Vacc. ccm		
50	Weisses Weibchen . .	1630	40	1630	1610	35	4 Stdn.	trächtig
51	Weisses Weibchen . .	1465	35	1480	1480	30	4 „	„
52	Weisses Männchen . .	1700	40	—	—	—	40 „ (B. anthr.)	—
53	Graues Männchen . .	2220	40	2270	2200	40	8 „	—
54	Weisses Weibchen . .	1800	40	1820	—	—	60 „ (B. anthr.)	trächtig
55	Graues (franz.) Weibchen	3030	40	2840	2820	40	12 „ „	„
56	Graues Männchen . .	1820	40	1680	1680	35	4 „	—
57	Graues Weibchen . .	1525	35	1580	1560	35	56 „ „	splenect.
58	Schwarzes Männchen . .	1470	40	1480	1460	35	4 „	„
59	Graues Weibchen . .	1225	35	—	—	—	5 Tagen „	„

Die 10 Versuche der Tabelle XII kann man in zwei Abtheilungen zerlegen. Die erste, kleinere, besteht aus den 3 Versuchen 52, 54 und 59; die betreffenden Kaninchen gingen nach der ersten intravenösen Injection zu Grunde. Der zweite Theil umfasste die übrigen Versuche, welche mit dem Tode sämmtlicher Kaninchen nach der zweiten Injection erster Vaccine endigten.

Die Zusammenstellung der Kaninchen in den Versuchen der Tabelle XII war eine mannigfaltige; darunter waren 4 Männchen und 6 Weibchen, davon 4 trächtige; ein Männchen und ein Weibchen war vorher splenectomirt worden.

Nach der ersten intravenösen Injection gingen zu Grunde: ein Männchen (Versuch 52), ein trächtiges Weibchen (Versuch 54) und ein graues Weibchen (Versuch 59). Alle diese Kaninchen gingen 2 bis 5 Tage nach der Injection an Milzbrand zu Grunde; die übrigen Kaninchen verendeten nach der zweiten intravenösen Injection, die sie 3 Tage nach der ersten erhielten. Schon 2 Stunden nach der Injection war fast bei allen Kaninchen das Bild acuter Vergiftung zu beobachten: die Thiere lagen unbeweglich und schwer athmend da. 4 Stunden nach der Injection verendeten 4 Kaninchen, die Versuche 50, 51, 56 und 58, und nach 8 Stunden ging das Kaninchen von Versuch 53 zu Grunde. Im Blute der umgekommenen Kaninchen waren keine Bacillen zu finden, obgleich zur Cultur in einer Petri'schen Schale mehrere Blutstropfen verwandt wurden. Etwas länger, nämlich 12 Stunden, lebte ein grosses, graues Weibchen französischer Rasse, ein notorisch altes Thier (Versuch 55). Im Blute fanden sich Milzbrandbacillen. Bei der Section wurden 6 noch wenig entwickelte Embryonen aufgefunden. Am längsten von allen Kaninchen lebte ein graues splenectomirtes Weibchen, welches 56 Stunden nach der Injection an Milzbrand zu Grunde ging (Culturen).

Als Controlthiere können in gewissem Sinne 3 Kaninchen der Tabelle XI dienen, welche gleichfalls Vaccine aus dem zweiten Kolben am 14./V. bekamen; allein bei der ersten Injection, welche 10 Tage vor der zweiten stattfand, war diesen Kaninchen erste Vaccine unserer Zubereitung eingespritzt worden, worauf sie an Gewicht nicht abnahmen. Vielleicht ist es dem zuzuschreiben, dass von allen 10 Kaninchen, welchen die Injection erster Vaccine aus dem zweiten Kolben am 14./V. gemacht wurde, nur ein splenectomirtes Weibchen (Versuch 48) am Leben blieb und späterhin an der Infection mit homogener Cultur zu Grunde ging.

Somit erwies sich also die erste Vaccine aus dem Institut Pasteur als zu giftig für Kaninchen, denen sie in grosser Menge in's Blut injicirt wurde. Dabei wirkte sie bei subcutaner Infection von Mäusen ver-

hältnissmässig schwach, denn unter gleichen Infectionsbedingungen tödtete die erste Vaccine unserer Zubereitung die Mäuse viel schneller.

Hält man den Tod der Kaninchen in den Versuchen 52, 54 und 59 mit dem günstigen Verlauf des 48. Versuches zusammen, so kann man annehmen, dass die zweite Injection erster Vaccine die Kaninchen nicht so schnell umgebracht hätte, wären sie nicht schon vorher geschwächt durch die erste Injection, welche 3 Tage vor der zweiten stattgefunden hatte. Für eine solche Annahme sprechen auch die Versuche 47 und 49, in welchen junge splenectomirte Kaninchen nach der Injection relativ lange lebten, 18 und selbst 36 Stunden; diesen Kaninchen war die erste intravenöse Injection mit unserer ersten Vaccine gemacht worden.

Die Versuche der Tabelle XII wurden ungefähr so angestellt, wie es Roux und Chamberland empfehlen. Da aber nach der ersten Injection 3 Kaninchen zu Grunde gingen, so wurden zur zweiten Injection, welche 3 Tage nach der ersten stattfand, geringere Mengen erster Vaccine genommen, und dennoch gingen alle Kaninchen nach der zweiten Injection schnell zu Grunde.

Nachdem die Versuche mit den Vaccinen aus dem Pasteur'schen Institut fehlgeschlagen waren, enthielten wir uns weiterer Versuche mit Milzbrandvaccinen anderen Ursprunges, da die Angaben in der Litteratur auf keinen wesentlichen Unterschied zwischen diesen und den Pasteur'schen Vaccinen schliessen lassen. Damit schliessen wir die Beschreibung unserer Versuche über die Immunisirung von Kaninchen nach Roux-Chamberland'scher Methode.

Schluss.

Versuche des ersten Capitels. Unseren Versuchen über Immunisirung von Kaninchen mit Thymusvaccine sind die Versuche von Wooldridge zu Grunde gelegt, welche wir theils in derselben Gestalt wiederholten, wie sie der Autor beschrieben hat, theils mit einigen Abänderungen, welche sich sowohl auf die Bereitung der Thymusvaccine, als auch auf die Methode erstrecken, nach welcher die Kaninchen damit immunisirt wurden. Die Versuche der Tabelle I und II zeigten, dass die Concentration der wässerigen Lösung des Thymusextractes, die Dauer des Verweilens der Thymuscultur im Thermostat, die Methode der Filtration der Thymusvaccine und die anderen Bedingungen der Herstellung der immunisirten Flüssigkeit aus der Thymusdrüse für die Wirksamkeit der Immunisirung der Kaninchen nach der Wooldridge'schen Methode von nur geringer Bedeutung sind.

Hierbei ist Folgendes zu bemerken. Wenn man auch Anfangs auf Grund der in der Tabelle I und II enthaltenen Versuche sagen konnte, dass ein 15 Minuten langes Kochen der Thymuscultur ungenügend sei, und dass ein halbstündiges Kochen der Cultur bei 100° C. am geeignetsten zur Erzielung von Thymusvaccine erscheine, so erwies sich dagegen später, als in den Versuchen der Tabelle IV und V zur Injection eine Thymusvaccine gebraucht wurde, welche aus dicker, nicht mit Wasser verdünnter Thymusbouillon bereitet war, dass 15 Minuten genügten, um die Thymuscultur für Kaninchen unschädlich zu machen. Eine solche Differenz erklärt sich dadurch, dass die Concentration der Thymusbouillon-Lösung, welche zur Bereitung der Thymusvaccine gedient hatte, auf die Resistenz der Bacillen der Thymuscultur gegen die hohe Temperatur von Einfluss gewesen war. Trotzdem sind die Resultate der Immunisirung mit Thymusvaccine, die 15 Minuten im Dampfapparat gestanden hat, ebenso negativ, wie die Resultate mit solcher Vaccine, welche 30 Minuten lang im Dampfapparat verweilt hat.

Die Versuche der Tabelle III und IV führen zu der Annahme, dass die intravenöse Injection von Thymusvaccine die Immunität der Kaninchen gegen Milzbrand eher schwächt als steigert, und dass bei der Milzbrandimpfung der Kaninchen die Individualität derselben von grosser Bedeutung für den Ausgang der Versuche ist.

Aus den Versuchen der Tabelle V folgt, dass, wie wir auch die Thymusvaccine zubereiten mögen, die Injection derselben, ebenso wie auch die Injection anderer mehr oder weniger indifferenten Flüssigkeiten, die Kaninchen nicht vor Milzbrand schützt, die inficirten Kaninchen nicht heilt, und dass notorisch alte Kaninchen sich von den jungen durch grössere Unempfänglichkeit gegen Milzbrand unterscheiden.

Die Versuche der Tabelle VI zeigten, dass eine vorausgegangene Erkrankung der Kaninchen an Milzbrand, den sie glücklich überstanden hatten, dieselben nicht vor dem Tode durch eine zweite Infection schützt. Man kann im Gegentheil sagen, dass eine einmalige Milzbranderkrankung, indem sie die Kaninchen schwächt, dieselben noch empfänglicher macht für eine neue Infection.

Somit sehen wir in unseren Beobachtungen die Wooldridge'schen Versuche nicht bestätigt. In dieser Hinsicht stimmen unsere Resultate mit den von Brieger, Kitasato und Wassermann erzielten überein, welche dieselbe Frage durch Versuche an Mäusen und Meerschweinchen zu erforschen suchten. Hierbei ist zu bemerken, dass sogar in der Laboratoriumspraxis die Immunisirungsmethode mit Thymusextract hinter anderen, wirksameren Methoden zurückstand.

Versuche des zweiten Capitels. Zur Herstellung von Pasteur'schen Vaccinen gaben wir dem Thermostat von d'Arsonval deshalb den Vorzug, weil sowohl Pasteur selbst, der Erfinder der Vaccine, als auch Koch, welcher dessen Versuche nachgeprüft hat, ebenfalls diesen Thermostat benutzt haben. Es ging nicht gut an, einen Thermostat von anderer Construction zu gebrauchen, weil der d'Arsonval'sche Thermostat sich von anderen derartigen Apparaten dadurch unterscheidet, dass in ihm eine stetige Ventilation der erwärmten Luft stattfindet. Eine solche Verschiedenheit der Construction hätte Zweifel erwecken können, ob Pasteur'sche Vaccinen, die in einem anderen Thermostat gewonnen wären, ebenso tauglich zur Immunisirung sind, wie die im d'Arsonval'schen Thermostat bereiteten.

Die ersten 16 Versuche über Immunisirung von Kaninchen mit Pasteur'scher Vaccine, wie sie in der Tabelle VII enthalten sind, endigten mit dem Tode aller Kaninchen, theils während der Schutzimpfung, theils nach der Controlinfection mit virulenter Cultur.

Die nächsten 11 Versuche, welche die Tabelle VIII bildeten, standen den Immunisierungsversuchen nach Roux-Chamberland'scher Methode näher als die vorhergehenden; dessen ungeachtet fielen die Resultate der Immunisirung ebenso negativ aus wie vorher. Alle diese 11 Versuche wurden gleichzeitig angestellt und mit der gleichen Vaccine, was die Möglichkeit gab, die individuellen Verschiedenheiten im Verhalten der Kaninchen zur Vaccine deutlicher zur Anschauung zu bringen.

Die Versuche der Tabelle IX bestätigten die Schlüsse, welche aus den vorhergehenden Versuchen gezogen waren. Sie zeigten, dass die erste Vaccine, in grösserer Menge in's Blut eingeführt, die Kaninchen eher schwächt, als immunisirt, und dass 40^{cem} erster Vaccine für gewöhnliche Kaninchen eine zu grosse Dosis sind.

Somit sprechen die Versuche der Tabellen VII, VIII und IX gegen die Wirksamkeit der Immunisirung von Kaninchen nach der Methode von Roux und Chamberland, und zeigen, dass die individuellen Besonderheiten der Kaninchen von Bedeutung sind für die Erklärung des verschiedenen Verhaltens der Kaninchen zu den einzelnen Momenten der Immunisirung nach der genannten Methode.

In den Versuchen der Tabelle X bewiesen die Kaninchen eine grössere Unempfindlichkeit gegen Milzbrand, als die Kaninchen der vorhergehenden Versuche.

Aus den Versuchen der Tabellen XI und XII endlich geht hervor, dass bei Einführung der ersten Vaccine in's Blut nicht alle Präparate gleich unschädlich für die Kaninchen sind; so erwies sich z. B. das aus

dem Institut Pasteur stammende Präparat dieser Vaccine als zu giftig für unsere Kaninchen.

Wiederholen wir nun in Kürze die Schlussfolgerungen, zu denen wir gelangt sind.

1. Grosse Mengen erster Vaccine, Kaninchen direct in's Blut eingeführt, schwächen dieselben eher, als dass sie sie vor der Milzbrandinfection schützen.

2. Bei der Injection von grossen Dosen erster Vaccine in's Blut sind nicht alle ihre Präparate gleich unschädlich für die Kaninchen.

3. Kaninchen können zuweilen an der ersten Vaccine zu Grunde gehen, wenn sie ihnen nach der Roux-Chamberland'schen Methode in's Blut eingeführt wird.

4. Die erste Vaccine schützt Kaninchen nicht immer vor dem Tode durch subcutane Injection der zweiten Vaccine.

5. Die Kaninchen, welche die Schutzimpfung nach Roux-Chamberland'scher Methode überstehen, gehen gewöhnlich nach Infection mit virulenter Cultur von Milzbrandbacillen zu Grunde, und wenn auch Ausnahmen von dieser Regel vorkommen, so sind dieselben jedenfalls nicht der Wirkung der nach Roux-Chamberland'scher Methode angewandten Pasteur'schen Vaccine zuzuschreiben.

Zum Schluss einige Worte über die Immunisirung von Kaninchen durch intravenöse Injectionen grosser Mengen von Vaccine. Die im ersten und zweiten Capitel unserer Arbeit beschriebenen Versuche zeigen, dass man Kaninchen grosse Mengen Vaccine in's Blut injiciren kann. So wurden dem splenectomirten Kaninchen im 58. Versuch in 5 Malen 160^{cem} Vaccine verschiedener Herkunft in's Blut eingeführt; dem splenectomirten Kaninchen vom 18. Versuch wurden in 2 Malen 55^{cem} injicirt; im 20. Versuch erhielt das Kaninchen in 3 Partien 95^{cem} u. s. w. In den meisten anderen Versuchen bekam ein grosser Theil der Kaninchen mehr als 50^{cem} Vaccine. Trotz solcher Injectionen erwarben die Kaninchen nicht nur keine Immunität gegen Milzbrand, sondern wurden vielmehr geschwächt und zeigten erhöhte Empfänglichkeit im Vergleich mit den nicht vaccinirten Kaninchen. Hierzu kommt noch, dass nach unseren Versuchen auch die Durchwaschung des Blutes mit physiologischer Kochsalzlösung schwächend auf die Kaninchen einwirkt, so dass man annehmen darf, dass die intravenöse Injection von grossen Mengen jeder beliebigen Flüssigkeit Veränderungen im Blute der Kaninchen hervorruft, welche die Empfänglichkeit der letzteren für die Milzbrandinfection nur erhöhen. Ueberdies ist die Einführung grosser Vaccinemengen in's Blut praktisch schwierig zu bewerkstelligen, und obendrein nicht ungefährlich für das

Leben der Thiere. Die in Rede stehende Immunisirungsmethode ist somit in praktischer wie in theoretischer Hinsicht von nur geringer Bedeutung.

Stellen wir nun die Angaben in der Litteratur mit den Resultaten unserer experimentellen Untersuchung zusammen, so ergibt sich Folgendes. Wir besitzen gegenwärtig keine sicheren Methoden zur Immunisirung von Kaninchen gegen experimentelle Milzbrandinfection; wenn daher die Kaninchen, die nach beliebiger Methode immunisirt sind, hernach einer wirklichen Infection mit virulentem Material unterzogen werden, so gehen sie an Milzbrand zu Grunde, mit nur wenigen Ausnahmen, welche von Nebenbedingungen abhängen. Warum mit der gleichen Methode die einen Autoren positive, die anderen negative Resultate erzielten, ist schwer zu erklären. Vielleicht hängen die Differenzen in der Unempfänglichkeit der einzelnen Thierspecies gegen Milzbrand, sowie in der Wirksamkeit der verschiedenen Immunisirungsmethoden bis zu einem gewissen Grade davon ab, dass die Methodik der experimentellen Infection bis jetzt nicht endgültig ausgearbeitet ist. Da uns das Princip der Zubereitung homogener Culturen richtig schien, so benutzten wir zur Infection der Kaninchen eben diese Culturen, doch wollen wir nicht behaupten, dass die homogenen Culturen von Milzbrandbacillen, wie sie nach der Methode von Czaplewski bereitet werden, nicht weiterer Vervollkommnung bedürften.

Thesen.

1. Kaninchen zeigen bei künstlicher Infection mit Milzbrandbacillen individuelle Schwankungen des Empfänglichkeitsgrades. So sind notorisch alte Kaninchen widerstandsfähiger gegen Milzbrand, als junge.

2. Wenn Kaninchen eine künstliche Milzbrandinfection einmal überstanden haben, so sind sie dadurch vor dem Tode bei einer zweiten Infection nicht geschützt.

3. Die Immunisirungsmethode, welche in intravenöser Injection grosser Mengen von Vaccine besteht, ist unzulänglich in der Hinsicht, dass in Folge der durch die Injectionen bedingten Schwächung der Kaninchen die Empfänglichkeit derselben für Milzbrand gesteigert wird.

4. Die unter die genannte Methode gehörende Immunisirung mit Thymusvaccine, wie sie von Wooldridge vorgeschlagen ist, ergibt negative Resultate.

5. Ebenso negative Resultate erzielt auch die Immunisirung mit Pasteur'scher Vaccine nach der Methode von Roux und Chamberland.

a) Zuweilen gehen die Kaninchen nach der Injection einer grossen Quantität erster Vaccine zu Grunde; wenn sie aber nach derselben am Leben bleiben, so schützt sie das nicht immer vor dem Tode nach der subcutanen Injection zweiter Vaccine.

b) Die Kaninchen, welche die Schutzimpfung nach Roux-Chamberland'scher Methode überstehen, gehen nach der Controlinfection mit virulenter Cultur zu Grunde, und wenn Ausnahmen von dieser Regel vorkommen, so sind dieselben nicht der Wirkung der Pasteur'schen Vaccine zuzuschreiben.

Litteratur-Verzeichniss.

1. Arloing, Influence du soleil sur la végétation la végétabilité et la virulence des cultures du bacillus anthracis. *Comptes rendues*. 1881. T. CI. p. 535.
2. Derselbe, Influence de la lumière blanche et de ses rayons constituants sur le développement et les propriétés du bacillus anthracis. *Archives de Physiologie normale et pathologique*. 1886. Nr. 3. p. 209.
3. Baumgarten's *Jahresberichte*.
4. Behring, Ueber die Ursache der Immunität von weissen Ratten gegen Milzbrand. *Centralblatt für klin. Medicin*. 1888. Nr. 38. S. 681.
5. Bergonzini. Baumgarten's *Jahresberichte*. 1891. S. 150.
6. Blagovestchensky, Sur l'antagonisme entre les bacilles du charbon et ceux du pus bleu. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1890. p. 689.
7. Bonome, Der Diplococcus pneumonicus und die Bakterie der hämorrhagischen Kaninchensepticämie. *Fortschritte der Medicin*. 1891. Nr. 18. S. 743.
8. Bouchard, Influence qu'exerce sur la maladie charbonneuse l'inoculation du bacille pyocyane. *C. R. de l'acad. des Sc.* 1889. T. CVIII. p. 713.
9. Brieger, Kitasato, Wassermann, Ueber Immunität und Giftfestigung. *Diese Zeitschrift*. 1892. Bd. XII. S. 137.
10. Caro. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1893. Bd. XIV. S. 398.
11. Chamberland, Résultats pratiques de la vaccination charbonneuse. *Ann. de l'Institut Pasteur*. 1887. T. I. p. 301.
12. Chamberland et Roux, Sur l'atténuation de la virulence de la bactériémie charbonneuse sous l'influence des substances antiseptiques. *C. R. d. A. d. Sc.* 1883. T. XCVI. p. 1088.
13. Dieselben, Sur l'atténuation de la bactériémie charbonneuse et de ses germes sous l'influence des substances antiseptiques. *Ebenda*. 1883. T. XCVI. p. 1410.
14. Dieselben, Sur l'immunité contre le charbon, conférée par des substances chimiques. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1888. p. 405.
15. Dieselben, Vaccination charbonneuse des lapins. *Ebenda*. 1887. T. I. p. 513.
16. Charrin, Sur les procédés capables d'augmenter la résistance de l'organisme à l'action des microbes. *C. R.* 1887. T. CV. p. 756.

17. Charrin et Guignard, Action du bacille pyocyanique sur la bactérie charbonneuse. *Ebenda*. 1889. T. CVIII. p. 764.

18. Chauveau, De l'atténuation directe et rapide des cultures virulentes par l'action de la chaleur. *Ebenda*. 1883. T. XCVI. p. 553.

19. Derselbe, De l'atténuation des cultures virulentes par l'oxygène comprimé. *Ebenda*. 1884. T. XCVIII. p. 1232.

20. Chor, Traitement du charbon par le bicarbonate de Soude d'après la méthode de M. Fodor. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1891. T. V. p. 337.

21. de Christmas, Substances microbicides du Sérum et des organes. *Ebenda*. 1891. T. V. p. 487.

22. E. Czaplewski, Untersuchungen über die Immunität der Tauben gegen Milzbrand. *Ziegler's Beiträge*. 1889. Bd. VII. S. 47.

23. Derselbe, Weitere Untersuchungen über die Immunität der Tauben gegen Milzbrand. *Diese Zeitschrift*. 1892. Bd. XII. S. 348.

24. Derselbe, Ueber „homogene Cultur“ und ihre Begründung. *Arbeiten auf dem Gebiete der pathol. Anatomie und Bakteriologie*. 1892. Bd. I. S. 473.

25. Debatte über den praktischen Werth der Milzbrandschutzimpfungen. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1887. Bd. II. S. 702 u. 733.

26. Doehle, Beobachtungen über einen Antagonisten des Milzbrandes. *Ebenda*. 1890. Bd. VII. S. 383.

27. Eberth u. Schimmelbusch, *Die Thrombose nach Versuchen u. Leichenbefunden*. 1888.

28. Emmerich u. di Mattei, Vernichtung von Milzbrandbacillen im Organismus. *Fortschritte der Medicin*. 1887. S. 653.

29. Eraud und Hugounenq, Action de certaines couleurs d'aniline sur le développement et la virulence de quelques microbes. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1891. Bd. X. S. 615.

30. S. Feodorow, Zur Frage der künstlichen Immunität bei Cholera asiatica. *Festschrift*. Prof. J. Klein. Moskau 1892.

31. Flügge, Studien über die Abschwächung virulenter Bakterien und die erworbene Immunität. *Diese Zeitschrift*. 1888. Bd. IV. S. 208.

32. Fodor, Neuere Untersuchungen über die bakterientödtende Wirkung des Blutes und über Immunisation. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1890. Bd. VII. S. 753.

33. Gabritschewsky, Ein Beitrag zur Frage der Immunität und der Heilung von Infektionskrankheiten. *Ebenda*. 1891. Bd. X. S. 153.

34. Gamaleia, Étude sur la vaccination charbonneuse. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1888. p. 517.

35. Derselbe. *Les poisons bactériens*. Paris 1893.

36. Gramatchikoff, Recherches sur l'influence des extraits de thymus et des testicules sur l'infection charbonneuse. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1893. p. 812.

37. Hankin. Baumgarten's *Jahresberichte*. 1889. S. 155.

38. Derselbe. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1891. Bd. X. S. 396.

39. Hankin et Westbrook, Sur les albumoses et les toxalbumines sécrétées par le bacille charbonneux. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1892. p. 633.

40. Heim. *Lehrbuch der bakteriolog. Untersuchung und Diagnostik*. 1894.

41. Hueppe u. Wood, Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Saprophytismus und Parasitismus. *Berliner klin. Wochenschrift*. 1889. Nr. 16. S. 347.

42. Klemperer, Die Beziehungen verschiedener Bakteriengifte zur Immunisirung und Heilung. *Zeitschrift für klin. Medicin*. 1891. Bd. XX.

43. R. Koch. *Ueber die Milzbrandimpfung*. 1882.
44. Kostjurin u. Kraïnsky, Ueber Heilung des Milzbrandes durch Fäulnistoxine bei Thieren. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1891. Bd. X. S. 553.
45. Maltzew, Ueber die Bedeutung der Stoffwechselproducte der Milzbrandbacillen. *Russkaja Medicina*. 1891. Nr. 11. (Russisch.)
46. Manfredi. Baumgarten's *Jahresberichte*. 1887. S. 361.
47. K. Müller, Der Milzbrand der Ratten. *Fortschritte der Medicin*. 1893.
48. Ogata u. Jasuhara, Ueber die Einflüsse einiger Thierblutarten auf Milzbrandbacillen. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1891. Bd. IX.
49. Pawlowsky, Heilung des Milzbrandes durch Bakterien und das Verhalten der Milzbrandbacillen im Organismus. Virchow's *Archiv*. 1887. Bd. CVIII. S. 494.
50. Derselbe, Behandlung und Heilung des Milzbrandes mittels einiger Proteine. *Centralblatt für allgem. Pathologie* von Kahlden. 1894. S. 411.
51. Pane. Baumgarten's *Jahresberichte*. 1891. S. 149.
52. Pasteur, Roux u. Chamberland, De l'atténuation des virus et de leur retour à la virulence. *C. R.* 1881. T. XCII. p. 429.
53. Dieselben, De la possibilité de rendre les moutons réfractaires au charbon par la méthode des inoculations préventives. *Ebenda*. 1881. T. XCII. p. 662.
54. Dieselben, Le vaccin du charbon. *Ebenda*. 1881. T. XCII. p. 666.
55. Petermann, Immunité contre le charbon par les albumoses. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1892. p. 32.
56. Derselbe, Sur la substance bactéricide du sang, décrite par le Prof. Ogata. *Ebenda*. 1891. p. 506.
57. Pinna, Ueber die Wirkung des Meerwassers auf die Virulenz der Milzbrandbacillen. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1894. S. 816.
58. Roger, Maladies infectieuses communes à l'homme et aux animaux. *Traité de médecine*. 1891. T. I. p. 517.
59. Rummo und Bordoni. Baumgarten's *Jahresbericht*. 1889. S. 536.
60. Salmon und Smith. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1887. Bd. II. S. 543.
61. Senn. *Bakteriologie chirurgicale*. Paris 1890.
62. Serafini und Erriquez. Baumgarten's *Jahresberichte*. 1891. S. 150.
63. Smirnow, Ueber das Wesen der Abschwächung pathogener Bakterien. *Diese Zeitschrift*. 1888. Bd. IV. S. 231.
64. Toussaint, De l'immunité pour le charbon acquise à la suite d'inoculations préventives. *C. R.* 1880. T. XCI. p. 135.
65. Derselbe, Procédé pour la vaccination du mouton et du jeune chien. *Ebenda*. 1880. T. XCI. p. 303.
66. Marshall Ward. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1893. Bd. XIII. S. 563.
67. Woodhead und Wood, De l'action antidotique exercée par les liquides pyocyaniques sur le cours de la maladie charbonneuse. *C. R.* 1889. T. CIX. p. 935.
68. Dieselben. Baumgarten's *Jahresberichte*. 1890. S. 524.
69. Wooldridge, Versuche über Schutzimpfungen auf chem. Wege. *Archiv für Anatomie und Physiologie*. Physiol. Abth. 1888. S. 527.
70. Wosnessensky, Influence de l'oxygène sous pression augmentée sur la culture du bacillus anthracis. *C. R.* 1884. T. XCVIII. p. 314.
71. Wright. Baumgarten's *Jahresberichte*. 1891. S. 147.
72. Zagari. *Ebenda*. 1887. S. 405.