[Aus dem Instituto de Alfonso XIII in Madrid.]

Über Immunisierung gegen Milzbrand.

Von

Dr. F. Murillo,
Abteilungsvorsteher.

Zu praktischen Zwecken, d. h. zur Impfung von Vieh (Schafen, Ziegen und Rindern) gegen den Milzbrand, kommt bis heute im allgemeinen das Pasteursche Verfahren in Anwendung, wenngleich in einigen Ländern Abweichungen von diesem Verfahren vorkommen (z. B. das Verfahren von Deutsch in Ungarn; oder ähnliche Methoden, wie die von Chauveau in einigen Gegenden Amerikas).

Es ist bekannt, daß das Pasteursche Verfahren bekämpft worden ist, hauptsächlich in Deutschland, und daß dasselbe vielfach Anlaß zu bedauerlichen Verlusten gegeben hat. In der nachstehenden Arbeit beabsichtige ich indessen weder die Geschichte noch eine Kritik des Verfahrens zu schreiben, und wenn ich vorstehendes in Erinnerung bringe, so geschieht es nur, um die vorherrschende allgemeine Ansicht wiederzugeben, welche, obgleich sie das Pasteursche Verfahren als einen großen Fortschritt betrachtet, demselben doch, und mit Recht, große Unvollkommenheiten nachweist. Daher erklärt es sich auch, daß die Forscher um neue Immunisierungsmittel sich bemühen, und daß Marchoux in Frankreich, Mendez in Argentinien, Selavo in Italien und letzthin Sobernheim in Deutschland in der Serumimpfung ein sichereres Verfahren suchen.

Auch ich verfolge diese Idee, und kann hinzufügen, daß ich mit den Arbeiten zur Präparierung eines wirksamen Serums gegen Milzbrand bereits ziemlich weit fortgeschritten bin. Ich verzichte jedoch darauf, gegenwärtig hierüber zu sprechen, da der Zweck dieser Arbeit ist, einen neuen Impfstoff, oder besser gesagt, eine neue sichere und einfache Methode zu seiner Herstellung bekannt zu geben.

Ich beginne damit, darauf hinzuweisen, daß in Spanien der Milzbrand alljährlich großen Schaden unter den Schaf- und Ziegenherden verursacht und zwar nicht nur in bestimmten Gegenden, sondern in allen Provinzen, ohne weiteren Unterschied als den einer mehr oder minder großen Sterblichkeitsziffer, welche zwischen 5 Prozent und 50 Prozent schwankt. Die guten Jahre für eine Provinz oder Region pflegen für die andere schlechte zu sein und umgekehrt, mit Ausnahme der Herden, welche die Hitzeperiode in den großen Gebirgen zubringen. In einigen Gegenden tritt die Epidemie während mancher Jahre unter so bösen Vorzeichen auf, daß die Herdenbesitzer sich beeilen ihre Tiere zu opfern, damit sie nicht alle an Milzbrand zugrunde gehen. Und trotzdem wird in Spanien in ziemlich umfangreichem Maßstabe von der Impfung Gebrauch gemacht. Vom Pasteurschen Institut in Paris werden jährlich viele Tausende von Dosen in Spanien eingeführt, und es existieren außerdem zwei oder drei einheimische Institute, welche solche in nicht geringem Umfange abgeben. Leider sind die erzielten Resultate weit entfernt davon, zufriedenstellend zu sein. Alle Jahre wiederholen sich die Mißerfolge, und wenn es auch einige Viehzüchter gibt, welche erklären, zufriedengestellt zu sein, die große Mehrzahl derselben ist es nicht. Ich habe persönlich mit verschiedenen Züchtern Rücksprache genommen, und fast alle sagten dasselbe: Ein Jahr haben sie mit ausländischer Lymphe geimpft, und es ist alles gut gegangen; im folgenden Jahre haben sie die Operation wiederholt, aber mit mittelmäßigem oder keinem Erfolge, da sie mehr oder weniger dieselben Verluste erlitten, wie wenn sie nicht geimpft hätten; und wieder in anderen Jahren (im 3., 4. oder 5.) erwies die Impfung sich geradezu als schädlich; denn die Tiere starben mit großen Anschwellungen an der Impfstelle. In diesem letzteren Falle erhalten übrigens die Viehzüchter eine entsprechende Entschädigung, sagen entweder gar nichts und verzichten für immer auf die Impfung oder sie fahren fort zu impfen, bis sie die nächste Enttäuschung erleben. Dies ist der Fall sowohl bei Verwendung ausländischen als auch einheimischen Impfstoffes.

Derartige Vorkommnisse, über welche ich auch nähere Angaben machen könnte, ereignen sich alljährlich und beweisen, daß das Pasteursche „Vakzin“ einen schwer festzustellenden und zu bewahrenden Wirkungswert besitzt. Ist der Schutzimpfstoff zu stark, so ist der Schaden da und verursacht unter Umständen wahre Katastrophen; ist der Impfstoff zu schwach, so ist die Operation unnütz, da sie keine wirkliche Immunisierung zur Folge hat. Es ist ein schwieriges Unternehmen, die Mitte zwischen diesen beiden gefährlichen Extremen zu halten, weshalb man nach meiner Ansicht, ohne hiermit irgend jemanden zu nahe zu treten, auf alle Institute, welche Pasteursches „Vakzin“ produzieren,

das lateinische Sprichwort: „Aliquando dormitat bonus Homerus“ in Anwendung bringen kann.

Es ist deshalb ein gerechtfertigtes Bestreben, nach anderen Verfahren zur Abschwächung des *B. anthracis* zu suchen, welche einen sicheren, leichter zu gewinnenden und dauerhaften Impfstoff liefern. Der Zufall hat mir ein solches Verfahren verschafft, welches bereits praktisch erprobt worden ist.

Wie ich bereits in einigen spanischen Veröffentlichungen¹ auseinandergesetzt habe, hatte ich mir vorgenommen, die Einflüsse zu studieren, welche die durch einige Bakterien erzeugten Toxine auf das Leben anderer Bakterien ausüben, zu welchem Zwecke ich als vollkommen definierten Typus von Toxinen das Diphtherietoxin und als vollkommen bekannten Typus von Bakterien den *B. anthracis* ausgewählt habe.

Mein Diphtherietoxin tötete stets in 48 Stunden Meerschweinchen von 250 grm in einer Dosis von 0.005 ccm.

Mein *B. anthracis* tötete stets in 36 Stunden Meerschweinchen von 400 grm in einer Dosis von 0.001 ccm. (Kulturen in Bouillon von 2 × 24 Stunden.)

Die Idee, welche mich zu jenen Untersuchungen veranlaßte, war folgende: So wie es im Pflanzenreiche Pflanzen gibt, welche beim Wachsen in ihrem Boden Elemente zurücklassen, die dem Wachstum anderer Pflanzen entweder nützlich oder schädlich sind, so müssen auch die Bakterien, als Pflanzen, schließlich in ihrem Nährboden Elemente (Toxine, Proteine usw.) zurücklassen, die auf das Leben und die Eigenschaften anderer Bakterien Einfluß ausüben. Die Symbiosen und vor allem die Gärungen, bei welchen der Reihe nach und sozusagen methodisch gewisse Arten auftreten, nachdem die vorhergehenden ihre Mission beendet haben, so daß auf diese Weise verschiedene Entwicklungskreise entstehen, beweisen bereits, daß zwischen den Bakterien Zuneigung und Abneigung besteht.

Gewiß ist, daß bei gleichzeitiger Züchtung des *B. anthracis* in gewöhnlicher Bouillon und in filtrierter diphtherietoxin-haltiger Bouillon ich habe beobachten können, daß dieser Mikroorganismus in letzterer besser und in größerer Menge wuchs als in der gewöhnlichen Bouillon. Ferner habe ich festgestellt, daß der *B. anthracis* in der toxinhaltigen Bouillon morphologische und biologische Veränderungen erlitt.

¹ F. Murillo, Nuevo procedimiento de atenuación y Nueva vacuna anticarbuncosa. *Trabajos del Laboratorio de investigaciones biológicas etc.* Madrid 1904. Bd. III. — La vacuna anticarbuncosa T. *Boletín del Instituto de Sueroterapia, Vacunación y Bacteriología de Alfonso XIII.* T. I. Nr. 1 u. 3.

Die morphologischen Veränderungen sind Volumen- und Formveränderungen. Viele Bazillen werden dick und krümmen sich in wurstförmiger Weise; andere, die wenigsten, werden länger und von ungleichmäßiger Dicke, zahlreiche andere scheinen ihren normalen Zustand zu bewahren. In der Mehrzahl haben die Enden anstatt des von Koch in seinen klassischen Beschreibungen verzeichneten geraden oder konkaven Schnittes einen konvexen Schnitt.

Die Färbung ist ungleichmäßig. Einige imprägnieren sich mehr, andere weniger. Einige zeigen nur einzelne farbige Punkte, und wieder andere nehmen die normale Färbung an. Sehr häufig entdeckt man in dem Protoplasma der Bazillen die Ernst-Babesschen und die Bunge-schen Körperchen.

Die biologischen Änderungen beziehen sich auf die Schwächung der Virulenz und auf die Fähigkeit der Sporenbildung. Diese erhält sich während geraumer Zeit, verschwindet aber schließlich nach einem mehr oder minder häufigen Passieren durch Toxin; indem die Bazillen sich dabei in asporogene verwandeln. Wenn man jedoch einem Meer-schweinchen tödliche Quantitäten asporogener Kulturen injiziert, so erlangt der Bazillus die Fähigkeit der Sporenbildung wieder. Bevor der B. anthracis asporogen wird, verliert er nach und nach seine Virulenz, bis er sich in einen unschädlichen Stamm verwandelt. Diese Verminderung der Virulenz erreicht man bei einigen Stämmen eher als bei anderen. Einer meiner Bazillenstämme z. B. erforderte beim 21. Passieren $\frac{1}{2}$ ccm Kultur (3×24 Stunden in gewöhnlicher Bouillon), um Meer-schweinchen von 300 g^{rm} zu töten, während in einer meiner anderen Serien es erforderlich war, 70 mal zu passieren, um denselben Zweck zu erreichen. Es dürfte überflüssig sein zu erwähnen, daß das Passieren von Toxin zu Toxin durchschnittlich alle 8 Tage vorgenommen wurde, und daß, wenn man den Grad der Virulenz zu erproben wünschte, man die Kultur in gewöhnlicher Bouillon fortsetzte. Diese Kultur in gewöhnlicher Bouillon mit in Diphtherietoxin abgeschwächtem B. anthracis, ist, was ich „Vakzin T“ (vacuna anticarbuncosa T) nenne.

Aus der großen Serie der Abschwächungen, von der ersten so virulenten Aussaat in Toxin, wie es die Normalkultur ist, bis zur letzten, fast unschädlichen, habe ich nach zahlreichen Versuchen eine ausgewählt, und habe damit erreicht Meerschweinchen, Kaninchen, Ziegen, Schafe und Esel zu immunisieren.

Meerschweinchen. G. Sobernheim¹ sagt wörtlich folgendes: „Die Immunisierung von Meerschweinchen ist ein äußerst schwieriges

¹ Sobernheim, Immunität bei Milzbrand. Kolle-Wassermanns *Handbuch*.

Problem. Ob es überhaupt möglich ist, den Tieren einen solchen Grad von Immunität zu verleihen, daß sie wirklich die Infektion mit voll-virulentem Milzbrandmaterial vertragen, erschien mir selbst zweifelhaft, nachdem ich bei Anwendung der bei Kaninchen bewährten langsamen Immunisierungsmethode es höchstens bis zur Widerstandsfähigkeit gegen eine Kultur von der Virulenz des II. Vakzin Pasteur gebracht hatte, niemals aber zur Immunität gegen virulente Kultur. Es liegen indessen aus neuerer Zeit eine Reihe von Beobachtungen vor, nach denen in der Tat eine Immunisierung von Meerschweinchen selbst gegen eine virulente Kultur gelungen zu sein scheint.“

Aus diesem Abschnitte geht hervor, daß die Immunisierung von Meerschweinchen nur wenigen Forschern gelungen ist, und diejenigen, welchen dieses gelungen ist, haben es nur mit großen Schwierigkeiten erreicht.

Nun ist jedoch, mit der Kultur T, welche ich anwende, die Lösung des Problems außerordentlich leicht. In wenigen Wochen, ja Tagen, erreicht man es, Meerschweinchen gegen starke Dosis virulenter Kultur zu immunisieren, und habe ich selbst diese Probe beliebig oft wiederholt.

In nachstehendem gebe ich als Beispiel den Fortschritt der Immunisierung des letzten Meerschweinchens, an welchem ich die Probe gemacht habe, und unterlasse ich nicht dabei zu erwähnen, daß die virulente Normalkultur, deren ich mich bei allen Versuchen bedient habe, Meerschweinchen von 400^g stets in einer Dosis von 0.001^{ccm} tötet, ja sogar in kleineren Dosen, weshalb ich die genannte nicht als die tödliche Mindestdosis betrachte.

Meerschweinchen.

Tag	Gewicht	Einspritzung	Folgen
	540 ^g	—	gesund.
3. VII.		0.2 ^{ccm} Kultur T ¹⁵	24 bis 48 Stunden, nachher kleines verschwindendes Ödem.
13. VII.		0.4 „ „ „	keine örtliche Reaktion.
21. VII.		0.6 „ „ „	kleines Ödem, nachher Haar- schwund und kleine Knötchen.
2. VIII.	525 „	1.0 „ „ „	ohne örtliche Reaktion.
11. VIII.	515 „	0.03 ^{ccm} vollvirul. Kult.	„ „ „
18. VIII.	510 „	0.06 „ „	zirkumskriptes, in 24 Stunden verschwindendes Ödem.
25. VIII.	535 „	0.09 „ „	ohne Reaktion.
4. IX.		0.15 „ „	sehr kleines Ödem.
15. IX.	560 „	0.25 „ „	keine Reaktion.
25. IX.	575 „	0.50 „ „	leicht infiltrierte Stelle, nachher kleine Knötchen.
4. X.	575 „	1.0 „ „	keine Veränderung.
18. X.		1 ¹ / ₂ „ „	kleines Ödem, in 3 Tagen ver- schwindend.
30. X.	600 „	2.0 „ „	kleine, derbe Knötchen.

Also habe ich das letztmal mehr als 2000 sicher tödliche Dosen ohne Spur von Schaden eingespritzt.

Andere Meerschweinchen habe ich schneller immunisiert, d. h. in weniger Zeit und mit weniger Einspritzungen. Ich habe aber auch erreicht, Meerschweinchen durch die gemischte oder Simultanmethode zu immunisieren, indem ich zu gleicher Zeit an verschiedenen Stellen der Haut Serum von immunisierten Kaninchen und „Kultur T“ in größeren Dosen als die in obigem Beispiel aufgeführten, darauf Serum und virulente Kultur, und schließlich nur vollvirulente Kultur eingespritzt habe.

Kaninchen. Mit gleicher Leichtigkeit und größerer Schnelligkeit habe ich auch zahlreiche Kaninchen immunisieren können, indem ich damit begann, sie mit der „Kultur T“ zu impfen, und damit endigte, ihnen mehr als 2000 tödliche Dosen virulenter Kultur einzuspritzen. Diese Kultur tötete stets in 48 Stunden Kaninchen von 1500^{grm}, bei einer Dosis von 0.01^{cem}.

Kaninchen von 2050^{grm} Gewicht.

Tag	Einspritzung	F o l g e n
17. III.	1.0 ^{cem} Kultur T ¹⁵	mittelmäßiges, in 3 Tagen verschwindendes Ödem.
24. III.	2.0 „ „ „	Infiltration u. nachher kleine Knötch.
3. V.	0.5 „ „ „	kleines Ödem.
10. V.	1.0 „ „ „	—
17. V.	2.0 „ „ „	—
29. V.	4.0 „ „ „	Es bleibt ein etwa haselnußgroßes Knötchen, das ich später zur mikroskopischen Untersuchung benutzte.
10. VI.	6.0 „ „ „	
22. VI.	10.0 „ „ „	
3. VII.	15.0 „ „ „	
15. VII.	20.0 „ „ „	

Ziegen. Abgesehen von Meerschweinchen und Kaninchen sind Ziegen die am schwierigsten zu immunisierenden Tiere. Ich möchte fast behaupten, daß einige Ziegenarten ebenso empfindlich oder noch empfindlicher gegen die Wirkung des B. anthracis sind als das Kaninchen. Wenigstens ist mir während der zahlreichen, auf diesem Gebiete von mir durchgeführten Versuche 2 mal folgendes vorgekommen: Von einer abgeschwächten Kultur, welche in einer Dosis von $\frac{1}{2}$ ^{cem} subkutan eingespritzt beim Kaninchen Röte der Haut und vorübergehendes Ödem verursachte, wurde einer Anzahl Ziegen (12 das erstemal und 27 das zweitemal) eine Einspritzung von $\frac{1}{4}$ ^{cem} gemacht, wonach alle an Fieber erkrankten, Appetitlosigkeit und starke lokale Entzündung zeigten, und beide Male 50 Prozent starben. Hieraus geht hervor, daß $\frac{1}{2}$ ^{cem} kaum Veränderungen bei dem Kaninchen hervorrief, während $\frac{1}{4}$ ^{cem}, d. h. die Hälfte der Dosis, bei einem beträchtlichen Teil der Ziegen tödlich wirkte.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung befindet sich die Tatsache, daß ein II. Vakzin Pasteur, welches für Kaninchen unschädlich ist und das zur Schutzimpfung verschiedener Ziegen- und Schafherden diente, unter den Ziegen eine furchtbare Sterblichkeit verursachte, die bedeutend größer war als die unter den Schafen.

Ich nahm mir vor, drei Ziegen zu immunisieren, indem ich sie vorher mit der „Kultur T“ impfte, und es ist Tatsache, daß ich bei allen dreien mein Ziel erreichte. Nachstehend führe ich ein Beispiel auf, indem ich bemerke, daß die von mir verwendete virulente Kultur (dieselbe wie in den anderen in gegenwärtiger Arbeit erwähnten Versuchen) für Ziegen aller Größen absolut tödlich ist bei einer Dosis von 0.1 ^{cem}

Ziege von 36^{kg} Gewicht. — (Milchziege.)

Tag	Einspritzung	F o l g e n
27. VI.	0.25 ^{cem} Kultur T ¹⁵	kleine Infiltration der Haut und Unterhaut.
5. VII.	1.0 „ „ „	erbsengroße Knötchen.
13. VII.	0.12 „ vollvirul. Kultur	kleines zirkumskriptes, in 3 Tagen verschwindendes Ödem.
28. VII.	0.25 „ „ „	—
8. VIII.	0.50 „ „ „	ohne Reaktion.
16. VIII.	2.0 „ „ „	ausgeprägter Inguinalinfarkt.
25. VIII.	4.0 „ „ „	—
4. IX.	8.0 „ „ „	—
13. IX.	12.0 „ „ „	vergrößerte Inguinalganglien.
25. IX.	18.0 „ „ „	—
4. X.	25.0 „ vollvirulente Normalkultur	kleines wurstförmiges Ödem.
12. X.	30.0 „ desgl.	—
20. X.	40.0 „ „	unbedeutende lokale Reaktion.
30. X. ¹	50.0 „ „	—

Esel. Auch der Esel ist ein gegen den experimentellen Milzbrand ziemlich empfindliches Tier. Eine meiner Serien der „Kultur T“, welche bei einer Dosis von 1 ^{cem}, subkutan eingespritzt, bei einem gewöhnlichen Kaninchen von 2^{kg} zuerst ein Ödem und nachher ein Geschwür von der Größe einer Mark verursachte, hatte, einem jungen Esel eingepflegt, ein Ödem in der Schultergegend, mehrere Tage dauerndes Fieber und Anschwellung der Schulterganglien zur Folge. Dieser Esel verendete an einem traumatischen Unfälle, nachdem er größere Dosen virulenter Kultur erhalten hatte.

Ein anderer Esel, welcher den vorhergehenden ersetzte, widersteht

¹ Einige Ziegen haben jetzt mehr als 100 ^{cem} derselben Kultur erhalten. (Nachtrag bei der Korrektur.)

gegenwärtig großen Mengen virulenter Kultur, bei intravenöser Einspritzung, wie solches aus beifolgender Aufstellung hervorgeht:

Esel „Caifas“, 9 Jahre alt, 190^{kg} schwer, 37·4° normale Temperatur.

Tag	Einspritzung	Wirkung nach etwa 48 Stunden	
		Temperatur	Lokale Reaktion
9.II.	0·35 ^{ccm} Kultur T ¹⁵ subkutan	39·0°	mittelmäßiges Ödem.
22.II.	0·75 „ desgl.	37·6	keine Reaktion.
8.III.	0·12 „ vollvirulenter Kultur	38·0	sehr kleines Ödem.
12.III.	0·35 „ desgl.	38·9	kl. Ödem, Schwellung der Axillarganglien.
17.III.	0·75 „ „	37·9	—
27.III.	1·0 „ „	38·6	—
3.IV.	2·0 „ „	38·6	—
12.IV.	4·0 „ „	37·9	—
19.IV.	8·0 „ „	37·7	—
26.IV.	13·0 „ „	37·9	—
3.V.	17·0 „ „	38·2	—
10.V.	30·0 „ „	37·8	—
18.V.	40·0 „ „	39·0	ziemlich starkes Ödem.
29.V.	45·0 „ „	39·2	Axillarganglieninfarziert.
6.VI.	50·0 „ „	39·5	—
16.VI.	20·0 „ einer besond. virul. Kultur	39·7	breites Ödem.
29.VI.	20·0 „ desgl.	39·4	—
19.VII.	30·0 „ „	38·6	} Tier munter und frißt gut.
4.VIII.	45·0 „ „	38·8	
17.VIII.	60·0 „ „	38·9	
25.VIII.	1·0 „ desgl. intrav.	38·2	
4.IX.	5·0 „ „ „	38·2	
14.IX.	16·0 „ „ „	38·3	
25.IX.	30·0 „ „ „	38·3	
4.X.	45·0 „ „ „	38·9	
19.X.	65·0 „ „ „	38·8	
30.X.	85·0 „ „ „	38·3	
10.XI.	100·0 „ „ „	38·8	

Die weiteren Schicksale dieser und anderer immunisierter Tiere, sowie unsere Versuche zur Darstellung eines wirksamen Serums gegen Milzbrand, werde ich in Kürze in dem „Boletin del Instituto de Alfonso XIII“ erscheinen lassen.

Schafe. In Anbetracht des praktischen Zweckes dieser Studien habe ich zahlreiche Versuche mit Schafen angestellt: es sind deren gewiß mehr als 50, die ich bald an Abteilungen von 6 bis 10 Tieren, bald an Hunderten, bald an einzelnen ausgeführt habe. Die Notwendigkeit davon ergibt sich aus zwei Gründen:

1. weil es erforderlich war, aus der großen Reihe der Abschwächungen, welche die Methode zu meiner Verfügung stellte, eine Kultur auszuwählen, welche genügend energisch war, um zu immunisieren, und gleichzeitig genügend abgeschwächt, um keinen Schaden zu verursachen;

2. weil ich danach strebte, die Immunisierung durch eine einzige Einspritzung zu erreichen, d. h. unter Fortlassung des sogen. II. Vazins des Pasteurschen Verfahrens.

Außerdem hatte mich die Erfahrung gelehrt, daß die Versuche mit Kaninchen und Meerschweinchen zur Orientierung dienen können, um auf die Virulenz einer Kultur zu schließen, jedoch nicht direkt auf Ziegen und Schafe in Anwendung zu bringen sind. Den gleichen Grad von Empfindlichkeit gegen den *B. anthracis* kann man vielleicht bei Meerschweinchen, Ziegen und Schafen annehmen; das Kaninchen jedoch, welches von Pasteur als Zwischenglied zur Probierung der Schutzimpfstoffe gegen Milzbrand hingestellt wird, kann nicht als sicherer Anhaltspunkt dienen, denn es gibt Kulturen, welche Ziegen und manchmal auch Schafe bei geringerer Dosis töten als diejenigen, welche zur Tötung von Kaninchen erforderlich sind.

Am 26. XI. 1904 impfte ich 9 kleine Merino-Schafe von etwa 30 kg Gewicht mit $\frac{1}{4}$ ccm Kultur T¹⁵ auf der Innenseite des linken Schenkels. Dieselben zeigten keine weitere Veränderung als die nach 5 bis 6 Tagen erfolgende Bildung eines kleinen, etwa erbsengroßen Knötchens an der Impfstelle. 11 Tage später (am 7. XII.) spritzte ich denselben $\frac{1}{8}$ ccm virulenter Kultur mit Sporen ein, gleichzeitig auch einem Kontrollschaf von gleicher Rasse und Schwere. Die Operation erfolgte bei allen am rechten Schenkel und keines dieser Schafe zeigte irgendwelche, weder lokale noch allgemeine Veränderung, mit Ausnahme des Kontrollschafes, welches nach 5 mal 24 Stunden starb, unter allen durch die Autopsie festgestellten Begleiterscheinungen des Milzbrandes.

Am 26. XII. 1904 impfte ich fünf Schafe von 50 kg Gewicht mit 1 ccm Kultur T¹⁵ auf der Innenseite des linken Schenkels. Nach 48 Stunden zeigten alle ein kleines zirkumskriptes Ödem, mit Ausnahme eines Schafes, bei welchem die lokale Reaktion etwas stärker war und das Tier veranlaßte, zu hinken. Dieser Zustand geht jedoch vorüber und bei dem Tier verbleibt, wie bei allen übrigen, ein kleines Knötchen an der Impfstelle. Am 5. I. impfte ich drei von diesen Schafen $\frac{2}{8}$ ccm virulenter Kultur ein und den übrigen zwei Schafen $\frac{3}{8}$ ccm. Das Kontrollschaf erhielt $\frac{2}{8}$ ccm derselben Kultur. Letzteres stirbt nach 4 mal 24 Stunden und das Mikroskop und die Kulturen zeigen das Vorhandensein des *B. anthracis* im Blute. Die übrigen Schafe zeigen keine Veränderung.

Die letzten von mir angestellten Versuche bilden sechs in größerem Maßstabe, aber um diesen Artikel nicht zu ausgedehnt zu machen, werde ich nur zwei davon aufführen.

Im Bezirke von Guadalajara impfte ich während des Monates April 1905 eine Herde von 600 Schafen und Hammeln mit $\frac{1}{4}$ cem Kultur T¹⁵. In dieser Herde hatte sich die Krankheit bereits gezeigt; und noch wenige Stunden, bevor ich mit der Operation begann, verendete eines der Schafe in meiner Gegenwart. Die Autopsie desselben bestätigte die Diagnose auf Milzbrand. In derselben Herde blieben 200 zum Konsum der Stadtbevölkerung bestimmte Hammel ungeimpft.

Die Daten, welche mir der Viehzüchter gegen Ende September mitteilte, sind folgende: 1. von den geimpften Schafen sind nur drei gestorben, dem Anschein nach an der genannten Krankheit (ohne Autopsie); und 2. sind von den 200 nicht geimpften Tieren täglich mindestens 1 und an einigen Tagen 2 oder 3 gestorben, bis schließlich alle geschlachtet oder der Krankheit erlegen waren.

In der Umgegend von Madrid habe ich 650 Schafe und Hammel mit Kultur T¹⁵ und 250 mit Pasteurschem Vakzin geimpft. Von den 650 ersteren sind im Laufe des ganzen Sommers zwei gestorben; und von den 250 starben vier.

Angesichts der stets identischen Resultate, welche ich sowohl im Laboratorium als auf dem Lande bei Verwendung der „Kultur T“ erreicht habe, glaube ich behaupten zu können, daß ich im Besitze eines wirklichen Schutzimpfstoffes bin, der im ganzen vor dem Pasteurschen folgende Vorzüge besitzt:

1. Da die Abschwächung sich durch den Einfluß des diphtherischen Toxins auf den B. anthracis vollzieht, wird die Temperatur von 42°, welche bei dem Pasteurschen Verfahren zur Abschwächung erforderlich ist, vermieden. Von der gewöhnlichen Temperatur bis zu 37° ist irgend eine beliebige Temperatur anwendbar, wenngleich die besten Kulturen sich von 28° an zeigen. Im Sommer bei gewöhnlicher Temperatur und im Winter in einem Brütoven von 30 bis 35° erreicht man ausgiebiges Wachstum, ohne daß einige Grad mehr oder weniger auf die Virulenz der Kultur einwirken. Dieses ist ein großer Vorteil, da die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Thermoregulatoren bei 42° unangenehme Folgen herbeiführen.

2. Gleichzeitig mit der konstanten Temperatur werden auch die im Pasteurschen Verfahren angegebenen bestimmten Perioden entbehrlich. Vom 4. Tage der Kultur an, an welchem das Wachstum sehr reichlich ist, bis zum 15. oder 20. Tage erleidet die Virulenz keine merkliche Veränderung, und kann man infolgedessen die Kulturen an irgendwelchem

Tage als Impfstoff benutzen. Genaue, an Meerschweinchen vorgenommene Versuche haben mir bestätigt, daß ungefähr vom 20. Tage an die Kulturen beginnen, wieder einige Virulenz zu erlangen, jedoch in so schwachem Maßstabe, daß ich Schafe mit 30 Tage alten Kulturen geimpft habe, ohne weiteren Nachteil als eine kleine Ausdehnung der lokalen Reaktion.

3. Die Kombinierung von Kulturen in Toxin und in gewöhnlicher Bouillon ergeben eine ausgedehnte Abstufung verschiedener Virulenz, welche erlaubt, den zur Erreichung der Immunität mit einer einzigen Einspritzung von $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ ^{cem} erforderlichen Grad auszuwählen, unter Fortlassung des II. Vakzins der Pasteurschen Methode. In Gebieten jedoch, welche sehr stark unter Milzbrand zu leiden haben, und in solchen Ländern, wo Mißtrauen gegen die Nützlichkeit der Impfung herrscht, wird es ratsam sein, zwei Einspritzungen anzuwenden, deren erste etwas geringer sein soll als die in einem Zwischenraume von etwa 10 Tagen der ersten folgende zweite.

4. Die Messung der Virulenz ist sehr einfach. Die Erfahrung hat mir bewiesen, daß man nicht aus der Einwirkung auf das Kaninchen, sondern aus der auf das Meerschweinchen schließen soll. Ich könnte verschiedene Beispiele anführen von mit „Kultur T“ ausgeführten Experimenten, in welchen eine Dosis von 1 ^{cem} keine Kaninchen tötete, sondern nur ein Ödem und später ein nekrotisches Geschwür von der Größe einer Mark hervorrief, während die Hälfte der genannten Dosis bei den damit geimpften Schafen große Geschwüre und Fieber verursachte und stets einen hohen Prozentsatz tötete. Die Kultur, welche ich als Impfstoff verwende, verursacht in einer Dosis von 0.4 ^{cem} bei Meerschweinchen von 400 bis 500 ^{gmm} leichte Anschwellung der Unterhaut, welche in 48 Stunden verschwindet, ohne die Tiere zu töten. Wenn die Meerschweinchen von 250 ^{gmm} Gewicht sind, sterben einige nach 3 mal 24 Stunden, die anderen werden nach einigen Tagen Gewichtsverlustes wieder gesund, wobei die infiltrierte Stelle enthart und mit einigen nekrotischen Punkten behaftet bleibt.

Dies ist im allgemeinen das Ergebnis der von mir angestellten Untersuchungen, seit ich im Jahre 1903 meine ersten Beobachtungen veröffentlichte. Mein hauptsächliches Bestreben ist eine hochgradige Immunität der Tiere leicht zu erreichen, um ein wirksameres Serum zu erhalten, welches in der Medizin dazu dienen soll, den Karbunkel zu heilen, und für tierärztliche Zwecke geeignet ist zur Schutzimpfung zusammen mit normalen virulenten, d. h. nicht abgeschwächten Kulturen. Ob es mir gelingen wird, dieses Ziel zu erreichen, wird sich im Laufe der Zeit herausstellen.