[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“
zu Berlin.]

(Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. Gaffky.)
(Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Lentz.)

Vergleichende Untersuchungen über den Bacillus der Pseudotuberkulose.

Von

Dr. K. Saisawa,
Tokio.

Im Anschluß an die vorhergehende Arbeit möchte ich im folgenden noch kurz über die Ergebnisse meiner Versuche berichten, die ich im Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ in Berlin auf Anregung von Hrn. Prof. Dr. Lentz ausgeführt habe. Die von mir festgestellten Befunde dürften vielleicht von einigem Interesse sein; denn seit Preisz vor etwa 18 Jahren vergleichende Untersuchungen über vier von Tieren stammende Pseudotuberkulosebazillen anstellte, ist über derartige Untersuchungen nur wenig bekannt geworden. Meine Absicht war zunächst, meinen aus Japan mitgebrachten Stamm mit dem von Geheimrat A. Pfeiffer von einem rotzverdächtigen Pferde gezüchteten Stamme zu vergleichen, mit welchem er nach allen Beschreibungen fast ganz übereinstimmt (vgl. vorige Arbeit). Leider konnte ich diesen Bacillus nicht mehr erhalten. Deshalb habe ich zu meinen vergleichenden Untersuchungen 1. einen mir von Geheimrat Prof. R. Pfeiffer aus Breslau übersandten, 2. den von Abel aus Meerschweinchen gezüchteten Stamm aus der Krälschen Sammlung, 3. den von Dr. Lorey-Hamburg, und 4. den von Prof. Albrecht-Wien gefundenen, vom Menschen stammenden Bacillus herangezogen, über welche letzteren ich in meiner vorstehenden Arbeit kurze Literaturnotizen gebracht habe. Im folgenden berichte ich über meine Resultate.

Morphologie und kulturelles Verhalten.

Eine Vergleichung der fünf Bazillenstämme in 24 Stunden alten Kulturen auf schwach alkalischem Agar ergab im hängenden Tropfen und in Fuchsin gefärbten Deckglastrockenpräparaten hinsichtlich ihrer Größe und Gestalt fast völlige Übereinstimmung; sie waren alle pleomorph; neben kleinen Kokkenformen sah man deutliche Stäbchenformen. Der Pfeiffersche, der Albrechtsche und mein Stamm glichen sich ganz. Der Loreysche Stamm war rundlicher und größer, und der Abelsche etwas kleiner als jene. Bei allen war die Diploform vorherrschend. In flüssigen Nährböden, z. B. in Bouillon, hatten sie meist Stäbchenform und bildeten kürzere oder längere Ketten. Sie zeigten keine Eigenbewegung, und die Gramsche Färbung fiel negativ aus. In mit Löfflerischem Methylenblau oder Karbolfuchsinlösung gefärbten Trockenpräparaten färbten sich beide Enden der Bazillen manchmal stärker, während der mittlere Teil sich fast gar nicht färbte (Polfärbung). Besonders gut konnte man das in Ausstrichen aus kranken Geweben sowie von Gewebesaft mittels der Sobernheimschen Polfärbungsmethode nachweisen.

Auch in der Kultur auf künstlichen Nährböden stimmte mein Stamm mit den anderen überein. Eine unwesentliche Abweichung zeigte nur der Abelsche Stamm. Er bildete in Bouillon einen starken flockigen Niederschlag, während die obere Schicht der Flüssigkeit fast klar blieb. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich, daß die Bazillen durch die bei diesem Stamm besonders stark vorhandenen schleimigen Stoffwechselprodukte zusammengeklebt sind. Bei längerem Stehen der Bouillonkultur bildete sich eine Kahlhaut, doch kam es nicht zur Stalaktitenbildung wie beim *Pestbacillus*. Die Kulturen entwickelten einen faden Geruch. Die Indolreaktion — geprüft nach Kitasato und Ehrlich — fiel bei allen Stämmen negativ aus.

Verhalten in Testnährböden: Milch wird nicht koaguliert, Neutralrotagar (Traubenzucker) zeigt keine Gasbildung und verfärbt sich nicht; Lackmusmolke und Milchzuckernutroselösung zeigen nach 1 Tage eine deutlich blaue Farbe, die später noch etwas stärker wird; dagegen zeigen die Bazillen in Traubenzuckernutroselösung deutliche Säurebildung.

Selbst auf stark alkalischem Agar (1 Prozent) wachsen alle Bazillen im Brutofen ziemlich gut. Sie gedeihen sowohl bei 20 bis 37° gut, als auch bei niederen Temperaturen, z. B. entwickeln sie sich auf gewöhnlichem Agar sogar im Eisschrank (8 bis 10° C) nach 7 Tagen. In verschiedenen kohlehydrathaltigen Nährböden (2 Prozent Pepton-, 1.5 Prozent Kohlehydrat-, 0.5 Prozent Kochsalzlösung, dazu Lackmuslösung) zeigen alle Bakterien dasselbe Verhalten: Dextrose, Maltose, Lävulose, Galaktose, Arabinose, Rhamnose und Mannit werden von ihnen unter Säurebildung

vergoren, Laktose, Saccharose, Inulin, Dulcit, Sorbit, Inosit, Erythrit, Raffinose und Adonit dagegen nicht angegriffen. Die weiteren Beobachtungen über das Verhalten der Bazillen stimmen im wesentlichen mit dem in meiner ersten Arbeit Mitgeteilten, sowie mit den diesbezüglichen Veröffentlichungen von Albrecht und Lorey überein. Schließlich habe ich auch auf 2 und 3 Prozent Kochsalz enthaltendem Agar Kulturen angelegt. Bei 2 Prozent Kochsalzgehalt des Nährbodens zeigten die Bazillen ein kümmerliches Wachstum, auf dem 3 prozent. Kochsalzagar dagegen waren nach 3 Tagen keine sichtbaren Kolonien entstanden. Die Formen der auf dem ersten Nährboden gewachsenen Bazillen weichen zum Teil erheblich von der Normalform ab. Man sieht überwiegend längliche, fast spindelförmige Stäbchen. Manchmal sind sie von auffallender Länge, oft zu zweien, wie in Teilung begriffen, zusammenhängend. Häufig sieht man auch abnorm große, ovale oder mehr runde Formen. Bei der Färbung mit Karbolfuchsin und Löfflerschem Methylenblau färben sich besonders häufig die Enden, manchmal aber auch einige Stellen im Innern tiefer. Die eigentümliche, unförmige Gestalt, wie sie die Involutionsformen von Pestbazillen zeigen, konnte ich aber nicht nachweisen.

Tierversuche.

In meiner vorigen Arbeit habe ich ausführlich über Versuche mit meinem Pseudotuberkulosebazillenstamm berichtet. Im folgenden will ich in der Hauptsache über die Ergebnisse meiner mit den anderen vier Stämmen an Nagetieren — Kaninchen, Mäusen, Meerschweinchen und Ratten — vorgenommenen Versuche berichten. Besonderes Gewicht habe ich gelegt auf eine genaue vergleichende makroskopische Beobachtung der pathologisch-anatomischen Veränderungen der einzelnen Organe. In folgender Tabelle sind die wichtigsten Veränderungen zusammengestellt.

Tabelle I.
 Subkutane Impfung von Meerschweinchen.

Stamm	Gewicht des Meer- schweinch. in grm	Einverleibte Dosis leben- der 24stünd. Agarkultur	Ausgang	Pathologisch-anatomische Veränderungen
Pfeiffer- scher Stamm	350	2 Ösen	nach 12 Tagen †	Impfstelle stark geschwollen, eine dicke, eitrig, nekrotische Masse enthaltend. Netz zusammengerollt, auf ihm konfluierende Knötchen, Mesenterialdrüsen geschwollen. In der Lunge hier und da kleine Knötchen. Darmfollikel vergrößert.

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Stamm	Gewicht des Meer- schweinch. in gm	Einverleibte Dosis leben- der 24stünd. Agarkultur	Ausgang	Pathologisch-anatomische Veränderungen
Abelscher Stamm	340	2 Ösen	nach 14 Tagen †	Impfstelle, Netz und Leber wie vorher. Milz stark vergrößert und auf ihr zahlreiche miliär- bis hirsekorn-große Knötchen. Lunge entzündlich und ödematös, auf ihr viele Knötchen. Peribronchialdrüsen auch vergrößert.
Albrecht- scher Stamm	280	„	nach 9 Tagen †	Impfstelle geschwollen, narbiges Aussehen. Leber und Milz zeigen unzählbare kleine Knötchen. In der Lunge keine Knötchen. Darmfollikel vergrößert.
Lorey- scher Stamm	295	„	nach 10 Tagen †	Impfstelle wie bei Nr. 1. Netz strangartig zusammengeschrumpft. Leber, Milz, Lunge wie bei Nr. 1. Mesenterial- u. Peribronchialdrüsen geschwollen, darauf einige sehr kleine Knötchen.
Saisawa- scher Stamm	320	„	nach 12 Tagen †	Impfstelle stark geschwollen und narbig geschrumpft. Schnittfläche eitrig-nekrotisch. Leber und Milz sind von zahlreichen Knötchen durchsetzt. In der Lunge wenige Knötchen. Mesenterialdrüsen vergrößert.

Wie man aus Tabelle I sieht, gingen die Meerschweinchen bei subkutaner Impfung unter Abmagerung in 9 bis 14 Tagen zugrunde. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen zeigen bei allen Bazillenstämmen fast das gleiche Bild. Die Impfstellen sind stark geschwollen. Bei dem Pfeifferschen, dem Abelschen und dem Loreyschen Stamm sind die eitrigen Veränderungen stärker als bei den anderen Stämmen. Die Bauchorgane, und zwar die Leber und Milz, sind stark entzündlich vergrößert; auf ihnen sind stets weiß-gelbliche Knötchenbildungen vorhanden. In der Lunge bemerkt man mehr oder weniger zahlreich kleine Knötchen, mit Ausnahme des Albrechtschen Falles. In der Niere ist kein Knötchen vorhanden. Das Klatschpräparat eines Knötchens zeigt, daß es meist aus mehr oder weniger stark degenerierten Rundzellen und aus wenigen schmale oder blasige Kerne besitzenden Zellelementen besteht. Hier und da sieht man kleine und große Häufchen von kokkenförmigen Bazillen. Auch konnte ich aus den Knötchen und dem Blut, sowie aus der Pleura- und Peritonealflüssigkeit die Bazillen wieder züchten.

Intraperitoneale Impfung von Meerschweinchen.

Ich habe von jedem Stamm je 1 Öse 24stündiger lebender Agarkultur in die Bauchhöhle der Meerschweinchen (Körpergewicht 280 bis 350 g^{mm}) eingespritzt. Die mit dem Pfeifferschen und dem Albrechtschen Stamm geimpften Meerschweinchen starben nach 3 Tagen; das mit dem Abelschen Stamm infizierte nach 4 Tagen und das mit dem Loreyschen Stamm geimpfte nach 5 Tagen. Die Sektionsbefunde ergaben in allen Fällen fast gleiche anatomische Veränderungen. Die Bauchhöhle enthielt mehr oder weniger reichlich rötlich-gelbes Exsudat. Die Leber und Milz waren vergrößert. Die Nieren waren ebenfalls entzündlich hyperämisch. Das Netz war bei allen Tieren aufgerollt und strangartig geschrumpft. Es war mit kleineren und größeren gelblich-weißen Knötchen durchsetzt. Darmserosa, Harnleiter und die anhängenden Organe waren blutreich, ödematös. Die Mesenterialdrüsen waren manchmal vergrößert. In der Pleurahöhle sowie im Perikard hatte sich etwas Flüssigkeit angesammelt. Die Lungen waren hyperämisch. Es zeigten sich also in erster Linie Exsudate in den serösen Höhlen und starke entzündliche Erscheinungen in den Bauchorganen. Knötchenbildung fand ich indessen nur auf dem Netze.

Tabelle II.

Intraperitoneale Impfung von Kaninchen.

S t a m m	Gewicht des Kaninchens in grm	Verimpfte Dosis lebend. Agarkultur	A u s g a n g
Pfeifferscher Stamm	1800	3 Ösen	nach 14 Tagen †
Abelscher Stamm	2050	„	„ 20 „ †
Albrechtscher Stamm	2100	„	„ 11 „ †
Loreyscher Stamm	1900	„	„ 13 „ †
Seisawascher Stamm	2000	„	„ 10 „ †

Nach intraperitonealer Infektion starben Kaninchen also binnen 10 bis 20 Tagen. Die anatomischen Veränderungen waren fast die gleichen, wie ich sie bei meinem Fall natürlicher Infektion beim Menschen und bei den Meerschweinchen nach subkutaner Einspritzung gesehen hatte. Die Bauchhöhle enthielt ein gelbliches Exsudat, und das Netz war nach oben strangartig zusammengerollt. Auf der Leber, Milz und Lunge waren zahlreiche und sehr charakteristische Knötchen. Bei den nach längerer Zeit gestorbenen Kaninchen — Pfeifferscher und Abelscher Stamm — war die Milz bedeutend vergrößert. Bei dem mit dem Abelschen Stamm

infizierten Tiere bemerkte ich auf ihr erbsengroße Knoten mit einem dick-eitrigen Inhalt. Auch in der Lunge fanden sich verhältnismäßig große Knötchen. Bemerkenswert war ferner die Knötchenbildung im Knochenmark der Rippen und des Sternums. Schon durch die Knochenwand hindurch konnte ich hier eine größere Anzahl gelblich-weißer Fleckchen erkennen. Bei den mit dem Pfeifferschen, Abelschen und Albrechtschen Stamme behandelten Tieren konnte ich ferner Hyperplasie der Follikel im unteren Teil des Ileums und in der Ileocöcalgegend konstatieren; doch war keine Geschwürsbildung eingetreten. Auf der Niere hatten sich bei den mit dem Abelschen und Albrechtschen Stamm infizierten Kaninchen einige miliare Knötchen gebildet. Die Mesenterial- und Peribronchialdrüsen waren vergrößert.

Versuche an weißen Mäusen.

Nach subkutaner Impfung mit $\frac{1}{2}$ Öse lebender Bazillen starben die Mäuse in 8 bis 11 Tagen. Wenngleich auch die Befunde bei der Sektion nicht so auffallend waren wie bei den Meerschweinchen und Kaninchen, so waren doch Leber und Milz deutlich vergrößert, und ich bemerkte auf ihnen mehrere kleine, oberflächlich sitzende Knötchen. Die Lunge war hyperämisch, doch konnte ich auf ihr keine Knötchen entdecken.

Nach intraperitonealer Einspritzung von $\frac{1}{2}$ Öse lebender Kultur starben die Mäuse binnen 2 bis 3 Tagen. Es fanden sich Exsudat und fibrinöse Massen in der Bauchhöhle sowie eine entzündliche Schwellung der Bauchorgane, sonst aber keine bemerkenswerten Veränderungen.

Versuche an Ratten.

Nach intraperitonealer Einspritzung von $1\frac{1}{2}$ Öse lebender Bazillen gingen die Ratten in 4 bis 8 Tagen zugrunde. Das Netz schrumpfte zusammen wie bei den Meerschweinchen und war mit einer käsigen eitrigen Masse bedeckt. Die Leber und noch mehr die Milz waren vergrößert. Weiter zeigte sich keine bemerkenswerte Veränderung. Bei subkutanen Impfungen (einverleibte Dosis 2 Ösen) blieben alle Tiere am Leben; sie wurden dann nach 20 Tagen getötet und sezirt, es fanden sich jedoch keine pathologischen Veränderungen bei ihnen.

Aus obigen Tierexperimenten geht hervor, daß die Pathogenität aller untersuchten Bakterienstämme gegenüber Nagetieren, besonders Meerschweinchen, Kaninchen und Mäusen annähernd gleich ist. Besonders

ist die reichliche Knötchenbildung in den Bauchorganen, in der Leber und Milz auffallend. Bei den mit dem Pfeifferschen und Abelschen Stamm infizierten Tieren war die weit vorgeschrittene eitrige Einschmelzung der Knötchen bemerkenswert. Die Ratten zeigten bei meinen Versuchen in den Bauchorganen keine deutliche Knötchenbildung, während im Gegensatz hierzu Albrecht auch bei ihnen Knötchenbildung festgestellt haben will.

Verhalten der Bakterien gegen Immunserum.

Um die Immunitätsreaktionen an den Bazillen zu prüfen, habe ich Kaninchen mit den von mir untersuchten Stämmen auf intravenösem Wege immunisiert. Dazu wurden von 24stündigen Agarkulturen Kochsalzaufschwemmungen hergestellt und 1 Stunde lang auf 58° C erwärmt, so daß, wie die angestellten Kontrollen ergaben, die Bazillen sicher abgetötet waren. Als Anfangsdosis verimpfte ich $\frac{1}{4}$ Öse Agarkultur; in allmählich ansteigender Dosis gab ich den Tieren im ganzen mit acht Einspritzungen 10 Ösen Kultur. Die abgetöteten Bazillen wirkten auf Kaninchen stark giftig. Oft starben schon mehrfach vorbehandelte Tiere nach einer Einspritzung von 2 bis 3 Ösen plötzlich oder gingen unter starker Abmagerung ein. Ich habe die Einspritzungen an zwei Serien von Kaninchen gemacht, und auf diese Weise von jedem Stamm 2 Sera gewonnen. Da diese Sera bei der Auswertung fast gleiche Resultate lieferten, gebe ich im folgenden nur die Resultate von je einem Serum wieder.

1. Agglutinationsreaktion.

Die Agglutinationsversuche habe ich, wie die Tabellen IIIa bis IIIe zeigen, so ausgeführt, daß ich alle fünf Stämme mit allen Seris kreuzweis austitrierte. Dazu füllte ich zunächst in die Röhrchen 0.5^{cem} fallender Serumverdünnungen und gab dazu in jedes Röhrchen 0.5^{cem} einer Bazillenaufschwemmung von 1 Öse Kultur in $\frac{1}{2}$ ^{cem} Kochsalzlösung. Dadurch wurde das in den Röhrchen enthaltene Serum auf die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Konzentration verdünnt, und jedes Röhrchen enthielt nun in 1^{cem} Serumverdünnung 1 Öse Bazillenkultur. Ich war zu diesem Verfahren dadurch gezwungen, daß die Kulturen sich schlecht verrieben und krümelten; die dabei entstehenden Bröckel sanken bei kurzem Stehen der Aufschwemmungen zu Boden, nur bei dem Abelschen Stamm mußte die Aufschwemmung kurze Zeit zentrifugiert werden. Die Beurteilung der Reaktion geschah, nachdem die Agglutinationsproben 24 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatten, makroskopisch.

Tabelle III.

a) Agglutinationsversuch mit Pfeifferschem Serum.

Stamm	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:5000	0
Pfeiffer	+	+	+	+	+	+	—	—	—
Saisawa	+	+	±	—	—	—	—	—	—
Abel	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Albrecht	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Lorey	+	+	+	±	—	—	—	—	—

b) Agglutinationsversuch mit Saisawaschem Serum.

Saisawa	+	+	+	+	+	+	±	—	—
Pfeiffer	+	+	+	±	—	—	—	—	—
Abel	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Albrecht	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Lorey	+	+	+	±	—	—	—	—	—

c) Agglutinationsversuch mit Abelschem Serum.

Abel	+	+	+	+	+	+	+	—	—
Pfeiffer	+	+	+	+	+	+	—	—	—
Saisawa	+	+	+	+	+	±	—	—	—
Albrecht	+	+	+	+	+	±	—	—	—
Lorey	+	+	+	+	+	±	—	—	—

d) Agglutinationsversuch mit Albrechtschem Serum.

Albrecht	+	+	+	+	+	+	±	—	—
Pfeiffer	+	+	+	±	—	—	—	—	—
Saisawa	+	+	+	±	—	—	—	—	—
Abel	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Lorey	+	+	+	—	—	—	—	—	—

e) Agglutinationsversuch mit Loreyschem Serum.

Lorey	+	+	+	+	+	+	—	—	—
Pfeiffer	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Saisawa	+	+	±	—	—	—	—	—	—
Abel	+	+	±	—	—	—	—	—	—
Albrecht	+	+	±	—	—	—	—	—	—

Aus den Tabellen IIIa bis IIIe geht hervor, daß der Agglutinations-titer der Immunsera gegenüber dem homologen Stamme trotz vorsichtigen Verfahrens bei der Immunisierung und trotz Darreichung von ziemlich großen Mengen Bazillen verhältnismäßig niedrig ist. So beträgt der

Endtiter bei dem Pfeifferschen und Loreyschen Serum 1:1000, bei dem Abelschen Serum erreicht er 1:2000, und bei den anderen Seris (Saisawa und Albrecht) kaum 1:2000. Die vier Sera (Pfeiffer, Saisawa, Lorey, Albrecht) agglutinieren die heterologen Stämme bedeutend schwächer als die homologen Stämme, so daß die Reaktion erst in einer etwa 10- bis 20fachen Serumkonzentration eintritt. Dagegen wirkt das Abelsche Serum gegen alle Stämme fast gleich stark, wenn auch gegen die heterologen nicht ganz bis zu seinem Endtiter. Den Versuch habe ich ferner so wiederholt, daß ich die Röhrchen etwa 20 Stunden lang im Brutofen bei 37° C oder 3 Stunden lang bei 50° C stehen ließ. Bei diesen beiden Verfahren fielen die Reaktionen etwas deutlicher und stärker aus, doch trat kein Steigen des Titers ein. Dieser Ausfall der Agglutinationsprüfung ist sehr auffallend; er deutet auf eine große Verschiedenheit im Rezeptorenapparat dieser doch sicher sehr nahe verwandten, wenn nicht identischen Bakterienstämme hin. Die meisten gemeinsamen Rezeptoren scheint der Abelsche Stamm zu besitzen, während die anderen Stämme deren nur sehr wenige aufweisen. Notwendigerweise drängt sich hier die Frage auf, ob es sich bei den fünf untersuchten Stämmen tatsächlich nur um verwandte, nicht identische Stämme handelt, oder ob bei den Bazillen der Pseudotuberkulose der Nager der Rezeptorenapparat bei den verschiedenen Stämmen so verschieden ausgebildet ist, daß die Agglutinationsreaktion für ihre Identifizierung ungeeignet ist. Um diese Fragen zu prüfen, habe ich noch folgende Reihe weiterer Untersuchungen angeschlossen. Die Prüfung der Agglutinabilität der fünf Stämme gegenüber verschiedenen normalen menschlichen und tierischen Seris — Kaninchen, Meerschweinchen, Pferd, Hammel, Affe! — ergab keine Anhaltspunkte, da selbst in stärkeren Serumkonzentrationen (z. B. 1:10) bei keinem der Stämme Agglutination auftrat. Das Gleiche gilt von dem Verhalten der Bazillen gegenüber Pestserum aus dem Pasteurschen Institut. Nur in starker Serumkonzentration (1:10) bemerkte ich gelegentlich eine schwache, undeutliche Reaktion. Diese Beobachtung steht in einem Gegensatz zu der von Zlatogoroff, der bei den von ihm geprüften zwei Stämmen noch in Serumverdünnungen von 1:200 bis 1:500 — d. h. fast bis zu demselben Titer wie bei Pestbazillen — deutliche positive Reaktionen gesehen haben will.

Wenn auch meine Agglutinationsversuche ein spezifisch verschiedenes Verhalten der Bazillen der Pseudotuberkulose einerseits und der Pestbazillen andererseits erwiesen haben, so zeigen die beiden Bakterienarten doch andererseits in ihrer Form, in ihrem kulturellen Verhalten und bezüglich ihrer Pathogenität für Nagetiere eine bemerkenswerte Ähnlichkeit, worauf auch Galli-Vallerio und Zlatogoroff hingewiesen haben. Es

wäre deshalb eigentlich logischer, diese Bazillen mit dem Namen Pseudopestbazillen zu belegen, zumal auch die durch sie und den Pestbacillus hervorgerufenen pathologisch-anatomischen Veränderungen weitgehende Analogien aufweisen.

2. Präzipitationsreaktion.

Ferner prüfte ich das Verhalten von Kulturfiltraten gegen spezifisches Serum im Präzipitationsversuch. Als Antigen habe ich das Berkefeldfiltrat einer 2wöchigen Bouillonkultur, sowie das Zentrifugat einer gleichen Kultur verwandt. Trotz genauer Beobachtung konnte ich bei keinem Serum eine Ausflockung nachweisen.

3. Komplementbindungsversuch.

Den Versuch habe ich in üblicher Weise unter Beobachtung aller üblichen Kontrollen ausgeführt. Als Antigen habe ich in folgender Weise hergestellten wässerigen Bazillenextrakt benutzt. Ich schwemmte eine 24stündige Agarkultur in Kollischer Schale mit 5^{cem} destillierten Wassers auf und schüttelte die Bazillenemulsion bei Zimmertemperatur 48 Stunden lang im Schüttelapparat; alsdann wurde sie zentrifugiert und abpipettiert. Von diesem Extrakt verwendete ich bei dem Versuche 0.05^{cem}. Wie aus folgender Tabelle zu ersehen ist, konnte ich im Abelschen Serum komplementbindende Substanzen nachweisen. Die Extrakte aus allen fünf Stämmen verhielten sich diesem Serum gegenüber fast gleich; nur der Extrakt des homologen (Abelschen) Stammes ergab eine etwas stärkere Reaktion als die übrigen.

Tabelle IV.
Versuch mit Abelschem Serum.

Serum	Extrakt Abel	Extrakt Pfeiffer	Extrakt Saisawa	Extrakt Albrecht	Extrakt Lorey
0.1	H	H	H	H	H
0.05	H	H	H	H	H
0.02	H	SH	SH	SH	SH
0.01	SH	KK	GK	KK	GH
0.005	GK	FKL	FKL	FKL	FKL
0.002	FKL	KL	KL	KL	KL
0.001	KL	KL	KL	KL	KL
normales Kaninchen- Serum 0.2	KL	KL	KL	KL	KL

H = komplette Hemmung.

SH = starke Hemmung.

GH = Hemmung mit großer Kuppe.

KK = Hemmung mit kleiner Kuppe.

FKL = fast komplette Lösung.

KL = komplette Lösung

Das Pfeiffersche und Albrechtsche Serum gaben nur mit den Extrakten aus ihren homologen Stämmen geringe Wirkung, aber bewirkten selbst in Dosen von 0.1^{cem} keine komplette Hemmung, sondern nur Hemmung mit großer Kuppe. Auch mit den anderen Extrakten ergaben sie denselben Hemmungsgrad. Bei dem Saisawaschen Serum trat die komplette Hemmung mit dem eigenen Extrakt bei Verwendung von 0.05^{cem} Serum ein; aber mit anderen Extrakten erst bei 0.1^{cem} . Bei dem Loreyschen Serum zeigte sich bei 0.05^{cem} mit dem Extrakt des homologen Stammes starke Hemmung; bei Verwendung des Pfeifferschen und Saisawaschen Extraktes trat in 0.1^{cem} Serum starke Hemmung ein; bei den anderen beiden Extrakten Hemmung mit großer Kuppe. Die Reaktion war also bei den anderen vier Seris nur schwach und unspezifisch.

4. Schutzwirkung des Immunserums bei simultaner Bakterieninfektion.

Um festzustellen, ob durch Anwendung des obigen Immunserums infizierte Tiere gerettet werden können, und gleichzeitig seine Einwirkung auf einverleibte Bazillen zu prüfen, habe ich Bazillen und Immunserum simultan in die Leibeshöhle von Meerschweinchen eingespritzt. Ich habe nach 1 Stunde und nach 24 Stunden die Leibeshöhle mikroskopisch untersucht und die Tiere weiter beobachtet. Die Resultate dieses Versuches sind in den folgenden Tabellen Va und Vb zusammengestellt.

Wie man aus diesen beiden Tabellen ersieht, können Kaninchenimmunsera selbst in starker Konzentration (1:10) bei simultaner peritonealer Einspritzung von Bazillen des homologen Stammes oder heterologer Stämme das Leben der Meerschweinchen nicht retten. Die Resultate stimmen mit den Ergebnissen Loreys überein. Es trat in der peritonealen Höhle nach 1 Stunde unvollkommene Bakteriolyse ein, ebenso Phagozytose (bei Serumverdünnungen von 1:10 und 1:20 ziemlich deutlich). Nach 24 Stunden sah ich deutliche Granulabildung, massenhafte Leukozyten und Phagozytose, daneben aber noch freie Bakterien. Die Tiere gingen in 3 bis 4 Tagen zugrunde. Immerhin war eine geringe Verzögerung des tödlichen Ausganges bei den mit höheren Dosen des Immunserums behandelten Tieren und zwar bei Verwendung des homologen Stammes regelmäßig, bei Verwendung heterologer Stämme in einem Teil der Fälle bemerkbar; gleichwohl ist diese nicht so groß, daß man von einer ausgesprochenen, schützenden Wirkung des Immunserums sprechen könnte. Dabei ist aber andererseits in Betracht zu ziehen, daß es sich um verhältnismäßig geringwertige Sera handelte.

Tabelle Va.

Serumarten	Gewicht des Meerschw. in grm	1 cem der Serumverdünnung	Bazillensamm- und -menge	Peritonealexsudat nach 1 Stunde	Peritonealexsudat nach 24 Stunden	Ausgang
Abel	380	1 : 10	Abelscher Stamm 1 Ose	unvollkommene Bakteriolyse mit wenig Granulabildung. Ziemlich starke Phagozytose	deutliche Granulabildung, zahlreiche Leukozyten, starke Phagozytose, ganz wenige freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.
	400	1 : 20	desgl.	unvollkommene Bakteriolyse, schwache Phagozytose	deutliche Granulabildung, starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
	390	1 : 50	desgl.	ganz unvollkommene Bakteriolyse, schwache Phagozytose	Granulabildung, Phagozytose, viele freie Bazillen	nach 2 Tagen gestorben.
	380	normales Kan.-Serum 1 : 5	desgl.	fast gar keine Bakteriolyse, geringe Phagozytose	Phagozytose, zahlreiche freie Bazillen	nach 2 Tagen gestorben.
	390	Kochsalzlös. 1 cem	desgl.	desgl.	desgl.	nach 2 Tagen gestorben.
Saisawa	365	1 : 10	Saisawascher Stamm 1 Ose	unvollkommene Bakteriolyse mit geringer Granulabildg. Phagozytose	Granulabildung und sehr starke Phagozytose, sehr wenige freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
	390	1 : 20	desgl.	unvollkommene Bakteriolyse, zieml. starke Phagozytose	starke Granulabildung und Phagozytose. Viele freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
	385	1 : 50	desgl.	ganz unvollkommene Bakteriolyse, schwache Phagozytose	unvollkommene Bakteriolyse und starke Phagozytose, sehr viele freie Bazillen	nach 2 Tagen gestorben.
	390	normales Kaninchen-serum 1 : 5	desgl.	fast gar keine Bakteriolyse, geringe Phagozytose	unvollkommene Bakteriolyse und Phagozytose, zahlreiche freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.

Tabelle Va. (Fortsetzung.)

Serum- arten	Gewicht des Meerschw. in grm	1 ^{ccm} der Serum- verdünnung	Bazillen- stamm und -menge	Peritonealexsudat nach 1 Stunde	Peritonealexsudat nach 24 Stunden	Ausgang
Pfeiffer	380	1 : 10	Pfeiffer- scher Stamm 1 Ose	unvollkommene Bakteriolyse mit geringer Granulabildg., starke Phagozytose	deutliche Granulabildung, zahlreiche Leukozyten, starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
	365	normales Kaninchen- serum 1 : 5	desgl.	schwache Phagozytose	Phagozytose. Zahlreiche freie Bazillen	nach 2 Tagen gestorben.
Albrecht	380	1 : 10	Albrecht- scher Stamm 1 Ose	unvollkommene Bakteriolyse mit geringer Granulabildg., starke Phagozytose	sehr deutliche Granula- bildung, starke Phagozytose, zahlreiche Leukozyten, wenige freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.
	420	normales Kaninchen- serum 1 : 5	desgl.	fast gar keine Bakteriolyse, schwache Phagozytose	schwache Phagozytose, zahlreiche freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.
Lorey	345	1 : 10	Lorey scher Stamm 1 Ose	unvollkommene Bakteriolyse mit geringer Granulabildg.	deutliche Granulabildung und starke Phagozytose, zahlreiche Leukozyten, sehr wenige freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
	350	normales Kaninchen- serum 1 : 5	desgl.	ganz schwache Bakteriolyse, geringe Phagozytose	Phagozytose, viele freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.

Tabelle Vb.

Serum- arten	Gewicht des Meer- schweinchens in grm	1 ^{ccm} der Serum- verdünnung	Bazillen- stamm und -menge	Peritonealexsudat nach 1 Stunde	Peritonealexsudat nach 24 Stunden	Ausgang
Abel	385	1 : 10	Pfeiffer 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse mit geringer Granulabildg., schwache Phagozytose	deutliche Granulabildung, starke Phagozytose, sehr wenige freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
	410	1 : 10	Saisawa 1 Öse	fast gleiche Befunde wie oben	fast gleiche Befunde wie oben	nach 3 Tagen gestorben.
	400	1 : 10	Albrecht 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse. Phagozytose	Granulabildung, zahlreiche Leukozyten und Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.
	380	1 : 10	Lorey 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse und starke Phagozytose	zahlreiche Leukozyten und starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.
Saisawa	365	1 : 10	Pfeiffer 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse und Phagozytose	zahlreiche Leukozyten und starke Phagozytose, sehr wenige freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.
	380	1 : 10	Abel 1 Öse	wie oben	Granulabildung, starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 2 Tagen gestorben.
	385	1 : 10	Albrecht 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse mit geringer Granulabildg., Phagozytose	starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 2 Tagen gestorben

Tabelle Vb. (Fortsetzung.)

Serum- arten	Gewicht des Meer- schweinchens in grm	1 ^{cem} der Serum- verdünnung	Bazillen- stamm und -menge	Peritonealexsudat nach 1 Stunde	Peritonealexsudat nach 24 Stunden	Ausgang
Lorey	375	1:10	Pfeiffer 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse und Phagozytose	zahlreiche Leukozyten und starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
	385	1:10	Abel 1 Öse	fast gleiche Befunde wie oben	Granulabildung und starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.
	390	1:10	Saisawa 1 Öse	fast gleiche Befunde wie oben	fast gleiche Befunde wie oben	nach 3 Tagen gestorben.
Pfeiffer	385	1:10	Abel 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse mit geringer Granulabildg. und schwache Phagozytose	deutliche Granulabildung, zahlreiche Leukozyten, sehr starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
	390	1:10	Saisawa 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse und ziemlich starke Phagozytose	zahlreiche Leukozyten, starke Phagozytose und wenige freie Bazillen	nach 4 Tagen gestorben.
Albrecht	890	1:10	Pfeiffer 1 Öse	wie oben	Granulabildung und starke Phagozytose, sehr wenige freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.
	400	1:10	Saisawa 1 Öse	unvollkommene Bakteriolyse mit geringer Granulabildg. und schwache Phagozytose	Granulabildung, zahlreiche Leukozyt-n, starke Phagozytose, wenige freie Bazillen	nach 3 Tagen gestorben.

5. Verhalten aktiv immunisierter Meerschweinchen gegen subkutane Einspritzung von lebenden Bazillen.

Da die bisherigen Versuche, einen einwandfreien Beweis für die Identität oder Nicht-Identität der fünf Bazillenstämme zu erbringen, befriedigende Resultate nicht erbracht hatten, zog ich zur endgültigen Entscheidung der Frage noch den Versuch heran, zu prüfen, ob ein mit einem der Stämme aktiv immunisiertes Meerschweinchen gegen die Infektion mit einem der anderen Stämme wirksam geschützt ist. Hierzu habe ich zunächst mit jedem Stamm, und zwar mittels subkutaner Injektion bei 58° C abgetöteter Kultur 8 bis 10 Meerschweinchen immunisiert. Die verabreichte Dosis steigerte ich in 6- bis 7tägigen Intervallen von $\frac{1}{2}$ Öse bis 4 Ösen Kultur, indem ich bei jeder Injektion die Dosis verdoppelte. Mehrere Tiere starben während der Immunisierung an Marasmus oder infolge der Eiterungen, welche nach den Einspritzungen oft eintraten. Die Sektion dieser Tiere ergab keine sichtbaren pathologischen Veränderungen in den inneren Organen. Den am Leben gebliebenen immunisierten Meerschweinchen habe ich 10 Tage nach der letzten immunisatorischen Impfung je 2 Ösen lebender Bazillen von den verschiedenen Stämmen subkutan eingespritzt. Zur Kontrolle erhielten nicht vorbehandelte Meerschweinchen die gleichen Dosen lebender Bazillen. Die Resultate zeigt Tabelle VI.

Es blieben also alle immunisierten Tiere trotz der nachfolgenden Infektion mit einer sicher tödlichen Dosis lebender Kultur am Leben. Dagegen gingen alle Kontrolltiere in der üblichen Zeit zugrunde und alle wiesen die typischen anatomischen Veränderungen mit ausgedehnter Knötchenbildung auf. Bei den immunisierten Tieren trat nach der Einspritzung von lebenden Bazillen nur teilweise eine lokale Vereiterung ein, welche aber in etwa 10 Tagen durch Abstoßung der nekrotischen Gewebe, bzw. durch Entleerung des Eiters von selbst heilte. Aus dem Eiter konnte ich wieder die eingespritzten Bazillen züchten, woraus hervorgeht, daß keine lokale Immunität des subkutanen Gewebes stand. Nach 4 Wochen habe ich die Tiere getötet. Die Sektion (vgl. Tabelle VI) ergab nur bei den mit dem Abelschen Stamm immunisierten Meerschweinchen nach Einspritzung des Abelschen und meines Stammes und ferner bei dem mit dem Albrechtschen Stamme immunisierten Tiere nach Infektion mit Pfeifferschen Bazillen in Lunge und Leber einige kleine Knötchen, in denen aber weder mikroskopisch noch kulturell Bazillen nachgewiesen werden konnten. In der Milz und in den Mesenterialdrüsen, die meist geschwollen waren, fanden sich bei keinem der Tiere Knötchen.

Tabelle VI.

Zur Immunisierung benutzter Stamm	Gewicht des Meer-schweinchens in grm	Das Tier erhielt zwei Ösen lebender Kultur von Stamm	R e s u l t a t	Nach 4 Wochen getötet. Befund nach der Sektion
Pfeiffer	380	Pfeiffer	geimpfte Stelle vereitert, später abgestoßen und geheilt, bleibt am Leben	Milz etwas vergrößert. Mesenterialdr. geschwollen. Nirgends in den Brust- und Bauchorganen Knötchenbildung
	350	Saisawa	geimpfte Stelle wenig vereitert. Tier lebt	Milz groß. Einige Mesenterialdrüsen vergrößert.
	345	Abel	geimpfte Stelle vereitert, später abgestoßen. Tier lebt	Milz fast normal.
	300	Lorey	geimpfte Stelle schwierig verhärtet. Tier bleibt am Leben	Milz und Leber vergrößert (dunkelrot). Mesenterialdrüsen geschwollen.
	340	Albrecht	geimpfte Stelle induriert. Tier bleibt am Leben	Milz und Mesenterialdrüsen vergrößert.
Abel	355	Abel	geimpfte Stelle vereitert, später narbig geheilt. Tier bleibt am Leben	Milz stark vergrößert. In der Leber und Lunge einige kleine Knötchen.
	370	Pfeiffer	geimpfte Stelle vereitert, später gereinigt. Tier bleibt am Leben	Milz und Leber vergrößert. Mesenterialdr. geschwollen.
	350	Saisawa	geimpfte Stelle narbig, induriert. Tier bleibt am Leben	Milz stark vergrößert. In der Leber und Lunge einige kleine Knötchen. Mesenterialdrüsen geschwollen.
	340	Lorey	geimpfte Stelle wenig vereitert. Tier bleibt am Leben	Milz und Mesenterialdrüsen vergrößert.
	345	Albrecht	geimpfte Stelle vereitert, später abgestoßen. Tier bleibt am Leben	Milz und Leber vergrößert.
Albrecht	360	Albrecht	geimpfte Stelle vereitert, später geheilt. Tier bleibt am Leben	Milz ziemlich groß, ebenso Leber vergrößert, einige Mesenterialdrüs. vergrößert.
	320	Pfeiffer	geimpfte Stelle wenig vereitert. Tier bleibt am Leben	Milz stark vergrößert. In der Leber und Lunge einige kleine Knötch. Mesenterialdrüsen auch geschwollen.
	350	Saisawa	desgl.	Milz sehr groß. Mesenterialdrüsen geschwollen.
	340	Lorey	geimpfte Stelle induriert. Tier bleibt am Leben.	Milz und Leber, sowie Mesenterialdr. vergrößert.
	380	Abel	geimpfte Stelle vereitert, später abgestoßen. Tier bleibt am Leben	Milz und einige Mesenterialdrüsen vergrößert.

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

Zur Immunisierung benutzter Stamm	Gewicht des Meer-schweinchens in grm	Das Tier erhielt zwei Ösen lebender Kultur von Stamm	R e s u l t a t	Nach 4 Wochen getötet. Befund nach der Sektion
S a i s a w a	320	Saisawa	geimpfte Stelle vereitert, später abgestoßen. Tier bleibt am Leben	Milz etwas vergrößert. Mesenterialdrüsen geschwollen
	380	Pfeiffer	geimpfte Stelle induriert. Tier bleibt am Leben	Milz groß, einige Mesenterialdrüsen vergrößert.
	345	Abel	geimpfte Stelle induriert. Tier bleibt am Leben	Milz fast normal, einige Mesenterialdr. geschwollen.
	390	Lorey	geimpfte Stelle vereitert, später abgestoßen. Tier bleibt am Leben	Milz, Leber und Mesenterialdrüsen vergrößert.
	330	Albrecht	geimpfte Stelle vereitert, später gereinigt. Tier bleibt am Leben	Milz sehr groß. Mesenterialdrüsen auch vergrößert.
L o r e y	340	Lorey	geimpfte Stelle vereitert, später geheilt. Tier bleibt am Leben	Milz vergrößert.
	365	Pfeiffer	geimpfte Stelle wenig vereitert. Tier bleibt am Leben	Milz ziemlich groß, einige Mesenterialdrüs. vergrößert.
	320	Saisawa	geimpfte Stelle narbig verhärtet. Tier bleibt am Leben	Milz und Leber vergrößert, Mesenterialdr. geschwollen.
	380	Abel	geimpfte Stelle vereitert, später geheilt. Tier bleibt am Leben	Milz sehr groß, Mesenterialdrüsen vergrößert.
	345	Albrecht	geimpfte Stelle vereitert, später abgestoßen. Tier bleibt am Leben	Milz und Leber vergrößert.

	Gewicht des Meer-schweinchens in grm	Bazillenstamm, subkutan eingespritzte Dosis 1 Öse	A u s g a n g	Befund bei der Sektion
K o n t r o l l e n nicht immunisiert	380	Pfeiffer	nach 14 Tagen gestorben	typisch
	355	Saisawa	nach 9 Tagen gestorben	„
	360	Abel	nach 12 Tagen gestorben	„
	365	Lorey	nach 10 Tagen gestorben	„
	350	Albrecht	nach 11 Tagen gestorben	„

Diese Tatsache scheint mir sehr bemerkenswert zu sein. Da sich in der Milz gar keine Knötchen fanden, und in den Knötchen der Lunge und Leber keine Bazillen nachzuweisen waren, so läßt sich vermuten, daß die Bazillen bereits abgetötet waren, so daß die Tiere sich auf dem Wege zur Besserung befanden und sicher mit dem Leben davon gekommen wären. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen beweisen also, daß die aktive Immunisierung mit einem der Stämme ein wirksamer Schutz ist gegen die Infektion mit allen anderen von mir untersuchten Stämme.

Fasse ich die erhaltenen Resultate zusammen, so komme ich zu folgendem Schluß: Die geprüften fünf Bazillenstämme zeigen morphologisch und kulturell keine wesentlichen Unterschiede. Auch ihr Verhalten bezüglich der Säure- und Alkalibildung in den verschiedenen Kohlehydratlösungen ist stets das gleiche. Für Nagetiere — Meerschweinchen, Kaninchen und Mäuse — sind sie stark pathogen; die Tiere erliegen fast ohne Ausnahme der Infektion. Ihre inneren Organe zeigen bei nicht akutem Verlauf charakteristische anatomische Veränderungen, vorzugsweise bestehend in hochgradiger Schwellung und Hyperämie von Milz, Leber und Mesenterialdrüsen, sowie starker Knötchenbildung in fast allen inneren Organen. Diese Beobachtungen stimmen vollständig mit den Beschreibungen überein, die A. Pfeiffer und Preisz über ihren Pseudotuberkulosebacillus der Nagetiere geben. Die Serumreaktionen, und zwar die Agglutinations-, Präzipitations- und Komplementbindungsreaktion, sowie der Pfeiffersche Versuch ergeben sehr unsichere Resultate, so daß sie zur Identifizierung der verschiedenen Stämme dieser Bakterienart wenig geeignet erscheinen. Nur mit dem von dem Abelschen Bacillus stammenden Serum erhielt ich einigermaßen eindeutige Resultate. Dagegen sprach die Prüfung des durch aktive Immunisierung erzielten Impfschutzes gegen die nachfolgende Infektion mit lebender Bazillenkultur einwandfrei für die Identität der fünf von mir geprüften Stämme.

In der Praxis wird also bei der Diagnostik der Pseudotuberkulosebazillen der Nagetiere nicht die Prüfung der verdächtigen Kulturen mittels der gebräuchlichen, im Reagensglase vorzunehmenden Immunitätsreaktionen ausschlaggebend sein, sondern neben ihrem morphologischen und kulturellen Verhalten, sowie im besonderen auch den pathologisch-anatomischen Veränderungen beim infizierten Tiere vor allem die Prüfung des durch die aktive Immunisierung zu erzielenden Impfschutzes gegenüber einer vollvirulenten sicheren Pseudotuberkulosekultur.

Die von Lorey geäußerte Vermutung, daß der von ihm beschriebene Bacillus der Erreger der Pseudotuberkulose ist, haben meine Untersuchungen durchaus bestätigt.

Literatur.

Vgl. meine vorstehende Arbeit; außerdem:

Galli-Valerio, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1903. Bd. XXXIII.

Zlatogoroff, *Ebenda*. 1904. Bd. XXXVII.