[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Halle.]
(Direktor: Prof. Dr. P. H. Römer.)

Ein Beitrag zur Kenntnis der Aphthae tropicae (Sprew, Sprue).

Von

Privatdozent Dr. W. Schürmann und Dr. T. Fellmer.

(Hierzu Taf. VII.)

Vor einiger Zeit bot sich uns Gelegenheit zur bakteriologischen Untersuchung des Stuhles einer sprueverdächtigen Patientin; wir möchten das Ergebnis der Untersuchung, das mit den bei Sprue von Beneke erhobenen Befunden, sowie mit den Feststellungen von Justi und Ungermann grundsätzlich übereinstimmt, sie aber zugleich erweitert, kurz mitteilen.

Der Stuhl stammte von einer Dame, die vor einiger Zeit aus dem Osten, aus einer Spruegegend, nach Deutschland zurückgekehrt war. Die uns durch die Freundlichkeit von Herrn Geheimrat Beneke überlassene Stuhlprobe hatte ein hellbraunes Aussehen, reagierte sauer; Gas und Schaumbildung fehlten. Nach der klinischen Untersuchung war die Patientin in hohem Maße sprueverdächtig.

Es ist von verschiedenen Seiten über das Vorkommen von Bakterien von bestimmter Form im Stuhl bei Spruekranken berichtet worden, so von Thin und Fayrer, die aber ein Züchtungsverfahren nicht durchführten. Calmette hat das Vorkommen des *Bacillus pyocyaneus* in Spruestühlen beobachtet. Von Kohlbrugge wurden Oidien in den Fäzes, in der Schleimhaut der Zunge, der Speiseröhre und des Dünndarms von Spruekranken nachgewiesen. Kohlbrugge hält sie für eine neue Art, fühlte sich jedoch nicht berechtigt, ihnen eine pathologische Bedeutung beizumessen. Eine Bestätigung dieses Befundes konnte weder von de Haan bei der Untersuchung der Organe eines an Sprue Verstorbenen, noch von A. van der Scheer im Schabsei der entzündeten Zunge und im Mageninhalt erbracht werden. Dagegen konnte A. van der Scheer in den Fäzes von Aphthae-kranken oidium-ähnliche Gebilde nachweisen, wie dies ebenso in normalen und abnormalen Stühlen gelingt. Le Dautec hat eine Hefenart, Maurer eine Penizilliumart

isoliert. Knud Faber beschreibt in einem Falle Diplokokken, die sich in den Schleimflocken des Stuhles in Reinkultur vorfanden, die aber auch in den Ulzerationen und im Granulationsgewebe, das den Boden der Geschwüre bildete, zu finden waren. Ob diese Diplokokken in irgendwelche ursächliche Beziehung mit der Entstehung der Krankheit zu bringen oder nur als Saprophyten zu betrachten sind, läßt er dahingestellt. Beneke und Justi fanden grampositive Bazillen in den Dickdarmgeschwüren, in den Geschwüren an der Oberfläche der Zunge, des Ösophagus, Magens und Darmes. Auch in den bronchopneumonischen Herden wurden an Aktinomyzes und Streptotricheen erinnernde Bazillen nachgewiesen. Polak und Daniels haben in ihren Fällen vergeblich nach derartigen Bazillen gesucht.

Distass hat einen dem Friedländerschen *Bacillus* ähnlichen Spaltpilz aus den Fäzes gezüchtet, den er als *Bacillus spruae* bezeichnet; er hat damit einen Impfstoff hergestellt, der Heilung gebracht haben soll.

Im Mai des Jahres 1913 entdeckte Beneke in einem schaumigen Fettstuhl eines Spruekranken Reinkulturen von grampositiven Stäbchen, die später bei zwei weiteren Spruekranken (Patienten von Ad. Schmidt) in übereinstimmender Weise nachgewiesen wurden. Ungermann hat auf Veranlassung von Beneke die bakteriologische Prüfung eines dieser Spruefälle vorgenommen. Nach Beneke sind die aus diesem Falle gezüchteten, den Diphtheriebazillen nahestehenden Bakterien die Erreger der Sprue.

Das Ergebnis unserer Untersuchungen ist folgendes:

Das aus dem Stuhl angefertigte Grampräparat zeigte einen deutlichen Unterschied gegenüber dem mikroskopischen Bilde eines normalen Stuhles. Es fiel das reichliche Vorkommen von grampositiven Stäbchen auf, wie es bei anderen normalen oder pathologischen Stühlen nicht zu sein pflegt. Aus der beigegebenen Fig. 1, Taf. VII, ist ersichtlich, daß die grampositiven Keime eine eigenartige leicht gebogene Form zeigen, daß längere und kürzere Formen abwechseln, die kolbenartige Anschwellungen, Keulenformen zeigen und auch zuweilen hantelförmiges Aussehen infolge der keulenförmigen Anschwellung an beiden Polen aufweisen.

Die einfache Züchtung dieses Stäbchens auf Agar- und Serumnährböden gelang nicht. Nach 24stündigem Wachstum waren diese Nährböden vom *Bacterium coli*, von Streptokokken usw. bedeckt. Auch auf den für die Diagnose herangezogenen anderen farbigen Nährböden, wie sie bei der Typhusdiagnose verwendet werden, war ein Wachstum der im unmittelbaren Ausstrichpräparat gefundenen grampositiven Keime nicht zu finden. Ebenfalls mißlang der Versuch anaerober Züchtung. Soweit decken sich also unsere Beobachtungen mit denen von Ungermann.

Wir gingen alsdann zu einem anderen Verfahren über, das schon nach 24 Stunden den gesuchten Keim fast in Reinkultur brachte, während es Ungermann erst nach 2 Monaten gelang, aus den im Brutschrank aufbewahrten Fäzes eine Reinkultur zu gewinnen.

Wir stellten eine aus dem Kot mit Kochsalzlösung gemachte Aufschwemmung ins Wasserbad bei 56° C, brachten nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten langer Erwärmung aus der Aufschwemmung eine Öse auf eine Löffler-serumplatte. Nach 24 stündiger Bebrütung waren auf den Platten, die mit dem 10 und 20 Minuten lang erhitzten Material beimpft waren, reichlich andere Keime vorhanden. Die Kultur der 30 Minuten lang erhitzten Stuhlprobe ließ sehr viele eigentümlich aussehende Kolonien neben vereinzelter Kokken- und Colikolonien wachsen; diese eigenartigen Kolonien erwiesen sich bei mikroskopischer Betrachtung aus den gleichen Formen bestehend, wie wir sie im direkten Stuhlausstrich gesehen hatten. Auch hier Keulenformen, Hantelformen, Verzweigungen.

Die Keime bilden auf Serumplatten Kolonien von gelblicher Farbe und heben sich deutlich von dem elfenbeinweißen Serumnährboden ab. Die Kolonien haben ein trockenes, bröckeliges Aussehen und lassen sich auf den Serumnährböden mit der Öse hin und her schieben unter Beibehaltung ihrer Form. Bei älteren Kulturen wandelt sich die hellgelbe Farbe der Kolonien in dunkelgelb um. Der Rand der Kolonie erscheint gezackt, die Mitte erhaben (s. Fig. 2 u. 3, Taf. VII.). Die Serumkultur läßt sich mit der Öse nicht zu einer gleichmäßigen Aufschwemmung verreiben; in der Aufschwemmung bleibt sie bröckelig, ein Teil erhält sich anfangs an der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmend, um dann langsam zu Boden zu sinken.

Auf Agar, auf Glycerinagar wachsen die übertragenen Reinkulturen gut. Saure Nährböden lassen nach 24 stündiger und mehrtägiger Bebrütung bei 37° kein Wachstum erkennen.

Auf Endo- und Drigalskinährböden kein Wachstum; Bouillon bleibt klar (aerob und anaerob). Wie beim Diphtheriebacillus gelingt in kurzer Zeit Häutchenbildung. Unverändert bleiben Lackmusmolke und Milch. Gasentwicklung fehlt. Der von Thiel für die Diphtheriediagnose angegebene flüssige Nährboden zeigt die gleiche Reaktion wie bei Beimpfung mit Diphtheriebazillen, nur ist die Gerinnung bedeutend klumpiger, und die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit ist wasserklar. Beim Diphtheriebacillus ist sie dagegen trübe und rosa gefärbt. Das gefundene Bacterium bildet weder hämolytische noch peptisch wirkende Stoffe. Toxinbildung fehlt. Bemerkenswert für dieses Bacterium ist das beim Abbrennen der Kulturmasse an der Öse entstehende Knistern, wie es auch den Diphtherie- und Tuberkelbazillen eigen ist.

Die beschriebenen Bakterien, die somit der Gruppe der Diphtheriebazillen nahe stehen, sind unbeweglich. Über ihre morphologischen Eigenschaften geben die Figg. 4, 5 und 6, Taf. VII, Aufschluß.

Sie sind grampositiv, färben sich auch gut mit den einfachen Anilinfarben, nehmen aber den Farbstoff ungleichmäßig auf, wie die mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbten Präparate zeigen (Fig. 5, Taf. VII). Es erscheinen in dem schwach roten Bazillenleib dunklere eingelagerte Körnchen, die teils an einem Pol liegen, teils auch im Innern unregelmäßig verteilt sind.

Auch die Neisserfärbung, wie sie bei der Diphtheriediagnose angewandt wird, läßt, wenn auch nicht bei allen Individuen, an den Enden Polkörperchen und auch im Innern dunkelblaue Körnchen von wechselnder Größe erkennen; es sind ähnliche Bilder, wie sie der Diphtheriebacillus aufweist (Fig. 6).

Säurefest sind die Stäbchen nicht.

Die in den Bazillen gefundenen stark lichtbrechenden ovalen, an Sporen erinnernden Gebilde treten deutlich und ziemlich regelmäßig bei auf festen Nährböden gewachsenen einige Tage alten Kulturen auf und sind wohl als metachromatische Substanzen des Bazillenleibes aufzufassen. Gegen die Sporennatur spricht das Fehlen der Säurefestigkeit, das Vermögen, sich leicht mit den gewöhnlichen Anilinfarben zu färben und die geringe Hitzebeständigkeit.

Bei Abtötungsversuchen mit Hitze verhält sich das Bacterium wie folgt:

Im Wasserbade wird die Kultur in Aufschwemmung im Reagenzglase bei 50° C gehalten und zwar 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten. Nach den angegebenen Zeiten werden Ausstriche auf Serumplatten angelegt. Nach 18stündigem Bebrüten bei 37° ist nur bei den nach 10 und 20 Minuten angelegten Ausstrichen Wachstum erfolgt. Nach längerer Bebrütung und Beobachtung (42 Stunden) ist noch weiteres Wachstum zu verzeichnen bei 30, 40 und 50 Minuten, aber äußerst spärlich.

Kochen tötete schon nach 1 Minute,

30prozentiger Alkohol nach 5 Minuten,

60prozentiger Alkohol nach 1 Minute, und

90prozentiger Alkohol nach 5 Minuten langer Einwirkung die Bakterienaufschwemmung ab.

1prozentige Karbolsäurelösung läßt nach 1 und 5 Minuten keine abtötende Wirkung erkennen; dagegen tötet 5prozentige Karbolsäurelösung in 1 Minute und 1 prom. Sublimatlösung nach 2 Minuten ab.

Wasserstoffsuperoxyd in 3prozentiger Lösung zeigt Abtötung nach 1 Minute.

Immunitätsreaktionen

(Agglutination, Präzipitation, Anaphylaxie, Komplementbindung).

Die serologischen Methoden wurden von uns zur Klärung der Stellung unseres Bacillus zum Diphtherie- und Xerosebacillus herangezogen.

1. Agglutination.

Der Agglutination, die u. a. beim Typhus als diagnostisches Hilfsmittel eine große Rolle spielt, stellen sich bei den Diphtherie-, Xerose- und auch bei unseren Bazillen allerlei Schwierigkeiten entgegen. Es ist, wie schon Lubowski und Lipstein und später Schwoner und von Przewoski und Kaulbach angeben, nicht leicht, eine gleichmäßig bleibende Aufschwemmung herzustellen, die unbedingt zur einwandfreien Beurteilung erforderlich ist. Die Xerose- und Spruebazillen wachsen in festzusammenhängendem Rasen auf der Oberfläche der Nährböden und heben sich beim Abschwemmen schollenartig von demselben ab. Sie bilden kleine und größere zusammenhängende Partikel, die sich auch nach längerem Schütteln nicht leicht verteilen. Die Diphtheriebazillen haben eine Neigung zur Verklumpung und Sedimentierung.

Wir gingen bei der Herstellung einer gleichmäßigen Aufschwemmung so vor, daß wir den mit 0·85 prozentiger Kochsalzlösung abgeschwemmten Bakterienrasen mit sterilen Glasperlen längere Zeit im Schüttelapparat schüttelten ($\frac{1}{2}$ Stunde), zentrifugierten (5 Minuten) und die überstehende milchig aussehende Flüssigkeit zum Agglutinationsversuch benutzten. Auch haben wir nach den Angaben von Lubowski die nach dem Zentrifugieren erhaltene Emulsion mit Glyzerin versetzt, um eine Autoagglutination zu verhindern. Unsere Versuche wurden mit Sprueserum, Xerose- und Diphtherieserum in verschiedenen Verdünnungen mit den verschiedenen Bazillenaufschwemmungen angestellt (siehe Tabelle 1).

Die Sera wurden von Kaninchen gewonnen, und zwar durch mehrmalige intravenöse Einverleibung abgetöteter und lebender Bazillen (Diphtherie-, Xerose- und Spruebazillen).

Tabelle 1.
Agglutinationsversuche.
Sprueserum.

Verdünnungen des Serums	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$
Spruebazillen	++	++	++	++	++	+	Spur
Xerosebazillen	++	++	+	+	+	+	Spur
Diphtheriebazillen	+	+	+	0	0	0	0
Pseudodiphtheriebazillen	0	0	0	0	0	0	0

Xeroseserum.							
Spruebazillen	++	+	+	+	+	Spur	0
Xerosebazillen	++	++	+	+	+	+	+
Diphtheriebazillen	+	+	Spur	0	0	0	0
Pseudodiphtheriebazillen	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Diphtherieserum.

Verdünnungen des Serums:	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$
Spruebazillen	+	+	+	0	0	0	0
Xerosebazillen	+	+	+	0	Spur	0	0
Diphtheriebazillen	++	++	+	+	+	+	+
Pseudodiphtheriebazillen . .	0	0	0	0	0	0	0

Das Ergebnis der Agglutinationsversuche war folgendes:

1. Sprueserum agglutinierte den homologen Stamm und Xerosebazillen bis $\frac{1}{2000}$, Diphtheriebazillen bis $\frac{1}{100}$, Pseudodiphtheriebazillen überhaupt nicht.

2. Xeroseserum agglutinierte Spruebazillen bis $\frac{1}{1000}$, Xerosebazillen dagegen bis $\frac{1}{2000}$; Pseudodiphtheriebazillen nicht, Diphtheriebazillen nur bis $\frac{1}{50}$, wie normales Pferdeserum.

3. Diphtherieserum agglutinierte Diphtheriebazillen bis $\frac{1}{2000}$, dagegen Pseudodiphtheriebazillen nicht; Sprue- und Xerosebazillen nur bis $\frac{1}{100}$.

Man kann aus diesen mehrfach wiederholten Versuchen, die immer übereinstimmende Ergebnisse zeitigten, die Schlußfolgerung ziehen, daß der bei diesem Spruefall gefundene Bacillus dem Xerosebacillus verwandt ist.

2. Präzipitation.

Zur Gewinnung von Präzipitin wurden von uns Kaninchen mit abgetöteten und lebenden Kulturen (Sprue, Diphtherie, Xerose) mehrere Male durch intravenöse Injektion vorbehandelt. Als Antigen benutzten wir 6 Tage alte Bouillonkulturen. Das klare Filtrat derselben wurde in Präzipitationsröhrchen auf die entsprechenden Immunsera geschichtet.

Es ergab sich, daß

1. Sprueserum mit Diphtherie-, Xerose- und Spruebazillenbouillonfiltraten,

2. Xeroseserum mit Diphtherie-, Xerose- und Spruebazillenbouillonfiltraten keine Ringbildung bzw. Fällung auslösten.

Weiter verwendeten wir die von Ascoli für die Milzbranddiagnose angegebene Thermopräzipitinreaktion, die inzwischen auch bei anderen Infektionen in Anwendung gebracht worden ist.

Die Organextrakte eines mit der vermutlichen Spruekultur hochimmunisierten Kaninchens wurden nach der Vorschrift von Ascoli durch Auskochen der fein zerschnittenen Organe (Herz, Leber, Milz, Niere, Lunge) mit einem Zusatz von physiologischer NaCl-Lösung hergestellt.

Die wasserklar filtrierte Extrakte wurden in kleinen Kapillarröhrchen von 3 mm Durchmesser auf die verschiedenen Sera vorsichtig, um eine Durchmischung zu verhüten, geschichtet (Xerose-, Diphtherie- und Spruesera, gewonnen durch intravenöse und intraperitoneale Immunisierung mit abgetöteten und lebenden Bazillen). Es ergab sich keine Spur von einer Ausfällung.

3. Anaphylaxieversuche.

Es ist bekannt, daß es gelingt, mit Bakterien ebenso wie mit anderen Eiweißkörpern Anaphylaxie zu erzeugen. Die Bakterien enthalten spezifisches antigenes Pflanzeiweiß; man kann mit ihren Leibern oder daraus hergestellten Extrakten aktiv und mit dem Serum der behandelten Tiere passive Anaphylaxie hervorrufen, die ebenso wie die Agglutination oder Präzipitation spezifisch ist. Immerhin begegnet man bei der Bakterienanaphylaxie größeren Schwierigkeiten; sie tritt nach manchen Forschern nicht mit der gleichen Regelmäßigkeit auf wie z. B. die Serumanaphylaxie.

Es sind nach den mitgeteilten Versuchen ganz beträchtliche Mengen von Bakterien notwendig, um eine solche Sensibilisierung der Meerschweinchen herbeizuführen, daß bei der Reinjektion die Auslösung eines anaphylaktischen Shocks unter akutem Tod erfolgt.

In unseren Versuchen (aktive und passive Anaphylaxie) kam es uns auf eine Klärung der Stellung der aus dem Spruefalle gezüchteten Kultur an. Vielleicht war die Möglichkeit gegeben, durch die aktive und passive Anaphylaxie weitere Grundlagen zur Beurteilung der Beziehungen dieses Bacteriums zu dem Xerose- oder Diphtheriebacillus zu gewinnen.

a) Aktive Anaphylaxieversuche. Mit 0.2 g der vorsichtig ohne Hinzunahme von Nährbodenmaterial entnommenen Spruekultur wurden in einer physiologischen Kochsalzaufschwemmung Meerschweinchen von 200 g Gewicht intraperitoneal vorbehandelt. Nach 20 Tagen erfolgte die Reinjektion mit 0.1 g Bakterien pro 100 g Tier, und zwar wurden reinjiziert Spruebazillen, Xerosebakterien und Diphtheriebazillen.

Die Kontrollen sind in der Tabelle 2 mit angeführt.

Nach den aktiven Anaphylaxieversuchen können wir sagen, daß die mit Spruebakterien vorbehandelten Meerschweinchen durch spätere Einspritzung von Spruebakterien einem typischen anaphylaktischen Anfall

Tabelle 2.

Nr.	Vorbehandelt mit	Zeit der Reinjekt.	Dosis gewogener Bakterien pro 100 g (Meerschweinchengew.)	Ergebnis
1	—	—	0.1 Spruebazillen	gesund
2	—	—	0.1 Xerosebazillen	"
3	—	—	0.1 Diphtheriebazillen	"
4	0.2 g Bakt. subkut. Spruekultur	20 Tage	0.1 Spruebazillen	typ. anaphylakt. Anfall. † in 30 Sek.
5	desgl.	"	0.1 Xerosebazillen	typ. anaphylakt. Anfall. † in 1 Min.
6	"	"	0.1 Diphtheriebazillen	gesund

erlegen sind; dasselbe gilt für die in gleicher Weise vorbehandelten Meerschweinchen bei späterer Reinjektion von Xerosebazillen.

Diphtheriebazillen lösten bei mit Spruebazillen vorbehandelten Tieren keinen anaphylaktischen Anfall aus.

b) Passive Anaphylaxieversuche. Außer der aktiven haben wir auch die passive Anaphylaxie versucht. Auch hier kommt es auf geeignete Antigen- und Antiserumdosen an. Uns stand das Serum von mit Spruebazillen immunisierten Kaninchen zur Verfügung.

Die Meerschweinchen wurden mit 3 ccm Sprueserum intraperitoneal vorbehandelt. Nach 24 Stunden erfolgte die Injektion (intravenös) der verschiedenen Bazillen, Sprue-, Xerose- und Diphtheriebazillen, und zwar 0.2 g pro 100 g Gewicht in physiologischer Kochsalzlösung.

Tabelle 3.

Nr. der Tiere	Gewicht der Tiere	Vorbehandelt mit	Zeit nach Vorbehandlg.	Injektion Dosis pro 100 g Gewicht (Meerschweinch.)	Ergebnis
1	220 g	—	—	0.2 g Spruebaz.	gesund
2	200 g	—	—	0.2 g Xerosebaz.	"
3	210 g	—	—	0.2 g Diphtheriebaz.	"
4	210 g	3 ccm Sprueserum intraperitoneal	24 Std.	0.2 g Spruebaz.	typ. anaphyl. Anf. † in 1 Min.
5	200 g	desgl.	"	0.2 g Xerosebaz.	stark. anaphyl. Anf. † n. 36 Std.
6	200 g	"	"	0.2 g Diphtheriebaz.	gesund
7	200 g	3 ccm Normalserum intraperitoneal	"	0.2 g Spruebaz.	"
8	200 g	desgl.	"	0.2 g Xerosebaz.	"
9	200 g	"	"	0.2 g Diphtheriebaz.	"

Wir haben uns an die von Friedberger und Mita angegebene Methode gehalten.¹

Das mit Sprueserum vorbehandelte und mit Spruekultur reinjizierte Meerschweinchen geht innerhalb 1 bis 2 Minuten unter den ausgesprochenen Erscheinungen des anaphylaktischen Anfalls zugrunde. (siehe Tabelle 3)

Erscheinungen: Schnelle, oberflächliche Atmung, Urin und Kotabgang, Kratzen der Nase, Husten. Das Tier macht Sprünge, wälzt sich und stirbt.

Sektion: Typische Lungenstarre.

Das in gleicher Weise vorbehandelte und mit Diphtheriebazillen nachgeprüfte Tier bleibt gesund, das Xerosetier dagegen kratzt sich, hustet, ist wie gelähmt, bleibt einige Zeit auf dem Rücken liegen, erholt sich nur langsam nach 5 bis 10 Minuten, nach 2 Stunden bleibt es, auf den Rücken gelegt, in dieser Lage liegen. Nach 36 Stunden tot.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß es gelingt, durch Einspritzung von Sprueserum bei Meerschweinchen eine passive Anaphylaxie hervorzurufen, und daß diese passive Anaphylaxie zugleich auch gegenüber Xerosebakterien gilt. Auch hieraus kann auf eine nahe Verwandtschaft des Spruebacillus mit dem Xerosebacillus geschlossen werden.

Schließlich haben wir noch versucht, mit dem an sich ungiftigen bei Sprue gefundenen Bazillen sogenanntes Anaphylatoxin in vitro zu erzeugen.

Es wurde zu diesem Zweck eine gut gewachsene 24 Stunden alte lebende Spruekultur vorsichtig vom Nährboden abgekratzt und in 4 ccm frischem Normalmeerschweinchenserum verrieben.

Die Mischung kam 4 Stunden in den Brutschrank bei 37·5° C und darauf 18 Stunden in den Eisschrank.

Nach Abzentrifugieren des Bodensatzes wurde die klare Flüssigkeit einem Meerschweinchen in die Vena jugularis eingespritzt. 1 Minute nach der Einspritzung starb das Tier unter sehr schweren anaphylaktischen Erscheinungen.

Es gelingt also mit dem gefundenen Erreger Anaphylatoxin in vitro zu bilden.

4. Komplementbindung.

Die Komplementbindungsversuche wurden mit verschiedenen Antigenen ausgeführt. Wir verwendeten

1. Alkoholischen Leberextrakt von mit Spruebazillen immunisierten Kaninchen.

¹ Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. XX. S. 4777.

2. Alkoholischen Lungenextrakt von mit Spruebazillen immunisierten Kaninchen.

3. Spruebouillon auf $\frac{1}{10}$ Volumen eingedickt.

4. Normalbouillon auf $\frac{1}{10}$ Volumen eingedickt (als Kontrolle).

5. Bakterienantiforminextrakte nach K. Altmann und J. H. Schultz von a) Spruebazillen, b) Xerosebazillen.

Die Herstellung der Antigene 1 und 2 geschah folgendermaßen. Die entnommenen Kaninchenorgane wurden zerschnitten, im Mörser zerkleinert; auf 1 g Substanz kamen 5 g Alkoh. abs. Schüttelapparat 10 bis 12 Stunden. Zum Gebrauch filtriert.

Antigen 3 und 4 wurden auf dem Wasserbade auf $\frac{1}{10}$ ihres Volumens eingedickt. Die Antiforminextrakte unter 5 wurden nach der von Altmann und Schultz angegebenen Methode hergestellt.¹ 24stündige Kulturen wurden mit 5 ccm Aqu. dest. und 5 ccm 4prozentiger Antiforminlösung abgeschwemmt und der Wärme ausgesetzt.

Xerosebazillen lösten sich bei 60 bis 70° C in 30 Minuten. Spruebazillen, die sich bei der gleichen Vorbehandlung (75° C) nicht lösten, mußten mit stärkerer Antiforminlösung extrahiert werden. Zu dem Bodensatz setzten wir 5 Tropfen reines Antiformin und nach der Lösung der Bazillen 45 Tropfen H₂O.

Nach der Abkühlung wurde das stark alkalische und chlorreiche Antiformin, das nicht ohne Einfluß auf die roten Blutkörperchen ist, mit 10prozentiger H₂SO₄-Lösung neutralisiert und, um jede Spur freien Chlors zu entfernen, mit einer 10prozentigen Natriumsulfidlösung versetzt. Als Indikatoren dienten Lackmuspapier und Jodkaliumstärkepapier.

Den Ausfall unserer Versuche zeigt Tabelle 4.

Die verschiedenen Antigene wurden im Vorversuch auf ihre allein-hemmende und alleinlösende Dosis geprüft. Im Hauptversuch wurde die größte nicht hemmende und nicht lösende Antigenmenge verwendet.

Weiter wurde jedesmal die Titrierung des Komplements und Ambozeptors und damit die Einstellung des hämolytischen Systems vorgenommen. Der eigentliche Versuch setzt sich zusammen aus dem Hauptversuch und den Kontrollen.

a) Im Hauptversuch wurde dem Antigen, das in fallenden Dosen zur Anwendung kam, inaktiviertes Serum der Immuntiere in konstanter Dosis (0.2 ccm) und Komplement in der zweifachen Grenzdosis hinzugefügt. Hierauf kam die Mischung 1 Stunde in den Brutschrank bei 37°. Die $\frac{1}{4}$ Stunde sensibilisierten Schaffblutkörperchen in der Dosis 0.05 und hämolytischer Ambozeptor in der dreifachen Grenzdosis wurden dann aufgefüllt. Nach weiterem $\frac{3}{4}$ stündigen Verweilen im Brutschrank bei 37° und 12stündigem Stehenbleiben bei Zimmertemperatur wurde das Ergebnis abgelesen und nach 12 Stunden Aufenthalt im Kühlen wieder nachgesehen.

¹ Ztschr. f. Immunitätsf. 1909. Bd. II. Orig.

b) Die Kontrollen wurden

1. mit Normalkaninenserum,

2. mit Antigen auf seine alleinhemmende und alleinlösende Wirkung angesetzt,

3. wurde jedesmal das hämolytische System austitriert,

4. wurde das Immunsrum in der einfachen und doppelten Dosis auf Eigenhemmung geprüft.

Die Ergebnisse beruhen auf oft wiederholten, genau durchgeführten Versuchsreihen. Sie sind in der nächsten Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 4.

Komplementbindungsversuche.

Als Antigen: Organextrakte (Sprue-Kaninchen).

	a) Alkohol. Leberextrakt				b) Alkohol. Lungenextrakt			
Extraktdosis	0.1	0.05	0.025	0.01	0.1	0.05	0.025	0.01
Sprueserum	++++	++++	++++	++++	++++	++	+++	+++
Xeroserum	+++	++	+	Spur	++	+	Spur	Spur
Diphtherieserum	0	0	0	0	0	0	0	0
Normalserum	0	0	0	0	0	0	0	0

Als Antigen: Bakterienantiforminextrakte nach Altmann und Schultz.

	a) Spruebazillen				b) Xerosbazillen			
Extraktdosis	0.1	0.05	0.025	0.01	0.1	0.05	0.025	0.01
Sprueserum	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	+++
Xeroserum	++	++	++	+	++	++	+	+
Diphtherieserum	0	0	0	0	0	0	0	0
Normalserum	0	0	0	0	0	0	0	0

Als Antigen: eingedickte Spruebouillon und zur Kontrolle eingedickte normale Bouillon.

	a) Eingedickte Spruebouillon			b) Eingedickte normale Bouillon		
Extraktdosis	0.0001	0.00005	0.00001	0.0001	0.00005	0.00001
Sprueserum	++++	++++	+++	0	0	0
Xeroserum	+++	++	0	0	0	0
Diphtherieserum	0	0	0	0	0	0
Normalserum	0	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: ++++ kompl. Hemmung. +++ fast kompl. Hemmung. ++ starke Hemmung. + schwache Hemmung. 0 kompl. Lösung.

Der Komplementbindungsversuch zeigt, daß sowohl die alkoholischen Sprueorganextrakte als auch der Antiformin-Spruebazilleneextrakt und die eingedickte Spruebouillon mit Sprueserum einen starken Ausschlag, mit Xeroseserum einen ausgesprochenen positiven, wenn auch schwächeren Ausschlag geben. Diphtherieserum verhielt sich wie Normalserum.

Ferner ergaben Antiformin-Xerosebazilleneextrakte mit Xerose- und mit Sprueserum Komplementbindung. Mit Diphtherieserum erhielten wir keine Ablenkung.

Zusammenfassung.

1. Der bei Sprue gefundene Bacillus — wir möchten es dahingestellt sein lassen, ob er der wirkliche Erreger der Spruekrankheit ist — steht kulturell zwischen dem Diphtherie- und dem Xerosebacillus.

2. Die Versuche mit Agglutination, aktiver und passiver Anaphylaxie und Komplementbindung weisen auf eine besonders nahe Verwandtschaft mit dem Xerosebacillus hin.

3. Es gelingt mit diesem Bacillus Anaphylatoxin in vitro zu bilden.

4. Präcipitine lassen sich in den Kulturfiltraten und in dem durch Immunisierung mit dem gefundenen Erreger gewonnenen Immunserum nicht nachweisen.

5. Auch die Thermopräcipitation mit Organextrakten blieb ohne Ergebnis.

Literaturverzeichnis.

Beneke, Über die Spruekrankheit (Aphthae tropicae). *Verhandlung der deutschen pathologischen Gesellschaft*. Vierzehnte Tagung, gehalten in Erlangen vom 4. bis 6. April 1910.

A. Calmette, Étude expérimentale de la dysenterie ou entérocolite endémique d'extrême Orient. *Arch. de méd. nav.* 1893. p. 207.

A. Ditaso, Sur l'étiologie de la Sprue. *Bull. Soc. Path. exot.* 1914. Nr. 4.

Knud Faber, Et Tilfaelde of kronisk Tropediaréé (Sprue) med anatomisk Undersogelse of Tordojelseskanalen. *Hospitalstidende*. XLVII. Jahrgang. 1904. Nr. 12. S. 313.

Derselbe, Ein Fall chronischer Tropendiarrhöe (Sprue) mit anatomischer Untersuchung des Digestionstraktus. *Archiv für Verdauungskrankheiten*. Bd. X. 1904. Heft 4. S. 333.

J. Fayer, *Tropical Dysentery and Chronic Diarrhoea*. J. and A. Churchill. London. 1881.

Derselbe, Tropical Diarrhoea. In Davidson's *Hygiene and diseases of warm climates*. Young J. Pentland. 1893.

C. G. C. F. Greiner, Aphthae tropicae. *Geneesk. tijdschr. v. Ned.-Indie*. 1859. Dl. VI.

J. de Haan, Indische Spruw. *Ebenda*. 1902. Dl. XLII. afl. 3.

N. Hösslin und Kashiwado, Untersuchungen über Fettstühle. *Deutsches Archiv für klinische Medizin*. 1912. Bd. CV.

Karl Justi, Beiträge zur Kenntnis der Sprue (Aphthae tropicae). Beiheft 10, *Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene*. 1913.

J. H. F. Kohlbrugge, Een bijdrage tot de aetiologie der Indische spruw (psilosis). *Weekbl. v. h. Ned. Tijdschr. v. Gen.* II. N. 16. 1910.

Derselbe, Die Ätiologie der Aphthae tropicae. *Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene*. 1901. V. N. 12. S. 394.

Maurer, G., De aetiologie van beri-beri en psilosis. *Geneesk. Tijdschr. v. Ned. Indie*. 1903. Dl. XLIII. Afl. 6.

A. van der Scheer, Indische Sprue. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.* 1905. 1ste helft. N. 10.

Derselbe, Indische Spruw. *Ebenda.* 2de helft. N. 25. 1909.

Derselbe, Die tropischen Aphthen. *Handbuch der Tropenkrankheiten*, herausgegeben von Prof. Dr. Carl Mense. 1914. 2. Aufl. Bd. III. S. 451.

Ad. Schmidt, *Klinik der Darmkrankheiten.* 1912. T. I. S. 241.

George Thin, On the symptoms and pathology of psilosis (linguae et intestini). *Med.-Chirurg. Transact.* 1882 Vol. LXXV.

Derselbe, On a peculiar disease of hot climates. Psilosis linguae. Psilosis mucosae intestini. *Practitioner* XXXI, 3. 1883.

Derselbe, *Psilosis or „Sprue“.* J. and A. Churchill. London. 1897.

Derselbe, A case of psilosis cured by strawberries and milk. *Journ. of trop. med. Sept.* 1899. S. 49.

Ungermann, Über Sprue. Vortrag im Ärzteverein Halle. *Münchener med. Wochenschrift.* 1914.

Erklärung der Abbildungen.

Tafel VII.

Fig. 1. Ausstrichpräparat aus Spruestuhl (Gramfärbung). Zeiß: Oel-Immersion $\frac{1}{12}$. Okular 3.

Fig. 2. Junge (24 stündige) Spruebazillen-Kolonien auf Löffler serum. 12fache Vergrößerung.

Fig. 3. Ältere (36—42 stündige) Spruebazillen-Kolonien auf Löffler serum. 12fache Vergrößerung.

Fig. 4. Grampräparat einer 18 stündigen Spruebazillen-Reinkultur. Zeiß: Öl-Immersion $\frac{1}{12}$. Okular 4.

Fig. 5. Spruebazillen-Reinkultur (18 stündig). Karbolfuchsinfärbung (Löffler serum). Zeiß: Öl-Immersion $\frac{1}{12}$. Okular 4.

Fig. 6. Spruebazillen-Reinkultur (18 stündig). Färbung nach Neißer (Löffler serum). Zeiß: Öl-Immersion $\frac{1}{12}$. Okular 4.

Fig. 7. Spruebazillen-Reinkultur (20 stündig). Tuschepräparat (Burri). Zeiß: Öl-Immersion $\frac{1}{12}$. Okular 4.