

Über den Bordet-Gengouschen Keuchhustenbacillus, bes. Übertragungsversuche des Keuchhustens auf Tiere.

Von

Dr. Itsuyoshi Inaba,

Assistenzprofessor der Universitäts-Kinderklinik zu Kyoto (Direktor: Prof. Dr. I. Hirai),
Chefarzt der Kinderklinik des Dairen-Krankenhauses in der Mandschurei.

(Eingegangen am 22. Mai 1912. — Zum Abdruck gegeben von Herrn v. Pirquet.)

In letzter Zeit wurde der vor 6 Jahren zuerst von Bordet und Gengou beschriebene Bacillus von etlichen Forschern studiert und ist jetzt von mehreren, aber nicht allen Seiten mit großer Wahrscheinlichkeit als wirklicher Erreger des Keuchhustens anerkannt worden. Über das Vorkommen dieses Bacillus bei dieser Krankheit ist aus jeder bisher veröffentlichten Literatur in den letzten Jahren ersichtlich, daß der Bacillus in der großen Mehrzahl von Fällen, meistens aber in den Anfangsstadien der Krankheit zu finden ist, abgesehen von den Mitteilungen von Casagrandi, und E. und T. Savini, wonach der erste nur Bacillus Pertussis Eppendorf von Jochmann und Krause in großer Konstanz nachgewiesen hat, und die letzten beiden noch den Bacillus Z von Manicatide als wirklichen Erreger betrachten.

In betreff der Befunde bei anderen Krankheiten kann man nur die Erfahrung von Fränkel erwähnen, der den Bordet-Gengouschen Bacillus bei zwei nicht keuchhustenkranken Kindern antreffen konnte.

In bezug auf das kulturelle Verhalten des Bordet-Gengouschen Bacillus besteht aber ein Unterschied zwischen den Angaben der Anhänger: Klimenko und Finizio konnten den Bacillus auf jeden gewöhnlichen Nährboden übertragen, während Fränkel, Seiffert sowie Arnheim dieses nicht gelang, und Bordet und Gengou darauf hinwiesen, daß er nur auf Nährboden mit nicht coaguliertem Eiweiß wächst. Wenn auch einige fast übereinstimmende Berichte in bezug

auf die biologischen Reaktionen, besonders die von Bordet und Gengou eingeführten Komplementbindungsverfahren dieses Bacillus im Serum der Keuchhustenkranken oder Rekonvaleszenten schon von einigen Forschern, Klimenko, Arnheim, Seiffert, Shiga, Wollstein, Mentschikoff, Delcourt und Finizio bestätigend über den betreffenden Bacillus veröffentlicht wurden, so sind die Untersuchungszahlen im ganzen doch noch nicht genügend ausreichend, daß man dadurch den richtigen Schluß ziehen könnte. Überdies kann man auch in derartigen Berichten ein abweichendes Resultat von Fränkel finden, welcher nur einen positiven Fall unter fünf nachwies, während Klimenko, Seiffert je in einem Falle, Mentschikoff in zwei Fällen, Shiga in fünf unter sechs Fällen, Arnheim in 12 unter 15 Fällen und Finizio in sechs unter acht Fällen positive Reaktionen fanden.

Was die Übertragungsversuche dieser Krankheit auf Tiere betrifft, so erinnert man sich der Klimenko und Fränkelschen Berichte, welche man aber noch nicht als ganz einwandfrei annehmen kann. Nach der Mitteilung des erstgenannten Forschers wurde Keuchhusten bei 6 Affen künstlich mit Reinkultur des Bordet-Gengouschen Bacillus erzeugt, und 2 andere Affen wurden beim Zusammenwohnen mit den erkrankten auch von ihnen infiziert; nämlich bellender Husten ohne Reprise nach ein- bis fünftägiger Inkubationsdauer. Die Krankheitsdauer betrug bei 4 Affen höchstens nur 6 Tage, bei zweien dagegen 30—36, dann erfolgte der Tod; Klimenko stellte an den letzteren bei der Sektion katarrhalische Pneumonie fest. Bei Hunden gelang es ihm auch, Keuchhusten künstlich oder von erkrankten Hunden zu übertragen, welche aber größtenteils an Pneumonie zugrunde gegangen waren. Im Falle von Fränkel boten 2 Affen durch Übertragungsversuche das Bild von Keuchhusten dar, d. h. mit kurzen, krampfhaften, bellenden Hustenstößen, die etwa 8—10 Tage anhielten, in der letzten Zeit seltener wurden und dann verschwanden. Irgend eine Expektoration wurde während der ganzen Zeit nicht beobachtet. Arnheim erwidert gegen diese Versuche von Klimenko, daß die Versuchstiere immer erst nach Bestätigung ihrer völligen Gesundheit durch lange Beobachtung zum Versuche benutzt werden dürfen, und der „Husten“ zum Beweise gelungener Übertragung schwere Begleiterscheinungen von Keuchhusten, z. B. Erbrechen und Reprise, zeigen muß, weil Affen in Gefangenschaft häufig husten, oft an Tuberkulose leiden, und Hunde, in Gemeinschaft lebend, immer von Staupe befallen werden. Arnheims Kritik hat nicht gänzlich, aber teilweise richtig getroffen,

denn der Husten war bei Klimenkos Fällen nicht typisch und bei zwei länger hingezogenen Fällen traten katarrhalische Pneumonie in den Vordergrund. Klimenko hat auch mehrmals den Bacillus aus Nasenschleim zu Lebzeiten der Tiere und aus Schleim von Trachea bis zur Lunge isoliert, aber nicht mit biologischer Reaktion des Bacillus gearbeitet, womit er hätte zeigen müssen, daß die isolierten Bacillen mit den eben zum Versuch benutzten identisch waren. In Fränkels Fall kann man in gleicher Weise von ihm denselben Beweis fordern. Auch Klimenko hat Komplementbindungsreaktionen der Sera von Versuchstieren mit dem Bordet - Gengouschen Bacillus wohl an zwei Hunden positiv nachgewiesen, aber er hat es nur ganz beiläufig geschrieben, so daß man daraus nicht ganz klar wird. E. und T. Savini haben im letzten Jahre in ihrer Arbeit bezüglich des Z-Bacillus folgendes gesagt: „Es hat aber auch Autoren gegeben, welche ernstlich behauptet haben, daß man sogar einen echten Keuchhusten auf gewisse Tiere übertragen kann, sei es durch Krankenmaterial, sei es hauptsächlich durch Kulturen ihres vermuteten und von ihnen isolierten Keuchhustenerregers. Wir möchten jedoch bemerken, daß schon a priori eine solche Tatsache unmöglich scheint, und zwar ist es zunächst die klinische Erfahrung, die uns lehrt, daß noch niemals und von niemanden eine sichere Übertragung des Keuchhustens auf irgend ein Tier beobachtet worden ist, daß diese Infektionskrankheit auch spontan bei den Tieren gar nicht existiert, und es ist unmöglich gewesen, bei einer so weit verbreiteten Infektionskrankheit, wie der Keuchhusten es ist, und wo die verschiedensten Infektionsgelegenheiten für verschiedene Tierarten vorhanden waren, daß dieselben niemals an Keuchhusten erkrankten, obwohl sie tatsächlich dafür empfänglich wären.“ Er ist der Ansicht, daß wir experimentell bei Tieren den Keuchhusten überhaupt nicht erzeugen könnten. Zu diesem Schlusse ist er jedoch nur in bezug auf seinen Z-Bacillus berechtigt, weil er niemals experimentelle Versuche mit anderen vermutlichen Keuchhustenerregern angestellt hat.

Alles in allem: die Frage des wirklichen Erregers des Keuchhustens mit dem Bordet - Gengouschen Bacillus ist noch nicht gänzlich nachgewiesen; sie verlangt noch reichliche Nachprüfungen, die bei verschiedenen Epidemien, in verschiedenen Ländern und von vielen Forschern gearbeitet werden müssen. Ich habe mich in den letzten zwei Jahren, von Juni 1910 bis September 1911 in der Mandschurei mit diesem Thema teils kulturell, teils experimentell beschäftigt.

I. Methode zur Isolierung des betreffenden Bacillus.

Es ist nicht immer leicht, bei kleinen Kindern und Säuglingen Auswurf zu gewinnen, weil sie, wie allgemein bekannt, ihren Auswurf hinunterzuschlucken pflegen. Deshalb habe ich in den meisten Fällen dadurch Auswurf gewonnen, daß ich bei Kindern künstlich Hustenanfälle hervorzurufen veranlaßte, indem ich mittels eines Zungenspatels auf den Zungengrund drückte, und den bei jedem Hustenstoß heraufspringenden Auswurf mit dem Spatel herausbekommen habe, den ich leicht im Rachenraum sehen konnte. Diese Prozedur ist namentlich ratsam, weil man dadurch nicht nur Sputum auch selbst bei Säuglingen leicht herausbefördern kann, sondern auch verhältnismäßig reines Sputum erzielt, ohne daß es mit einem großen Teil von Speichel vermischt wird. Die Auswahl des Krankenmaterials bezog ich aus verschiedenen Lebensaltern, verschiedenen Krankheiten der Atmungsorgane, besonders aus solchen, welche bei der ersten Untersuchung die Diagnose von beginnenden Keuchhusten wahrscheinlich machte, und in allen Jahreszeiten.

Die Statistik wurde nur aus denjenigen Respirationskrankheiten zusammengestellt, welche erst nach langer Beobachtung, wenigstens von zwei Wochen sicher diagnostiziert waren.

Eines Teiles des Sputums bediente ich mich zur Herstellung der Ausstrichpräparate, welche nach Gramscher Färbung entweder mit Phenoltoluidinblau nach Kühne oder mit stark verdünnter Ziehlischen Lösung gefärbt wurden. Mit einem anderen Teile desselben habe ich nach einigen vorhergehenden Waschungen in physiologischer Kochsalzlösung Kulturen auf denjenigen Nährböden angelegt, welche wie folgt zubereitet wurden:

Man läßt 3% sterilisierten, gewöhnlichen, schwach alkalischen Agar-Nährboden in Reagensgläsern im Autoklaven schmelzen, in jedes Reagensglas zum noch warmen, aber nicht zu heißen Agar wird frisches, steril entnommenes, defibriniertes Ziegenblut hinzugesetzt, im Verhältnis von 10 : 2, mischt alle Teile möglichst gleichmäßig durch behutsames Schütteln der Reagensgläser untereinander und läßt dann alles in schräger Richtung erkalten.

Ich habe auch im Anfang den Bordet - Gengouschen Nährboden benutzt, aber nach vergleichenden Untersuchungen von verschiedenen zubereiteten Nährböden gefunden, daß mein oben angegebener Nährboden für erstes Züchten aus Sputum am geeignetsten ist. Denn der Bordet - Gengousche Nährboden, abgesehen von seiner umständlichen Herstellungsweise, schwärzt sich binnen einigen Tagen nach der Zubereitung, besonders bei Unterbringung im Brutofen, daß man so

winzig kleine Bakterienkolonien nur schlecht finden kann, und er ist so weich, daß das Herausgreifen einer einzelnen Kolonie erschwert ist, im Gegensatz zu meinem hellroten, ziemlich harten und einfach zubereitbaren Nährboden.

Für andere Zwecke, welche mit einem Male möglichst große Mengen von Kultur verlangten, z. B. bei Tierimmunisierung, Herstellung von Antigen, habe ich auch gern Shigaschen Nährboden benutzt, worauf dieser Bacillus auch nach meinen mehrmaligen Vergleichen mit verschiedenen Bakterienstämmen am besten wächst, sogar besser als auf dem Bordet-Gengouschen Nährboden. Shiga hat nämlich den Bordet-Gengouschen Nährboden dadurch modifiziert, daß er Bouillon anstatt Kochsalzlösung, Pferdeblut anstatt Kaninchenblut benutzte, und den Nährboden nach dem Hinzufügen des Blutes 20 Minuten lang auf 56—60° C erwärmte.

Auf diesem Nährboden habe ich anstatt Pferdeblut auch Ziegenblut angewendet. Wenn dieser Bacillus ganz gut an meinen Nährboden gewöhnt ist, dann genügt dieser reichlich, um fast die gleiche Bakterienmenge wie mit dem Shigaschen zu bekommen.

II. Untersuchungsergebnisse bezüglich des Zusammenhanges zwischen dem Bordet-Gengouschen Bacillus und den verschiedenen Erkrankungen.

Zu dieser Untersuchung habe ich insgesamt 80 keuchhustenkranke Kinder, einen ebensolchen erkrankten Erwachsenen und 18 an anderen Krankheiten der Atmungswege leidende Kinder gezogen; diese Kinder standen im Lebensalter zwischen dem 2. Lebensmonate und dem 9. Lebensjahre.

Bei mikroskopischer Untersuchung der Ausstrichpräparate ist es mir gelungen, in 78 Fällen unter 81 Keuchhustenkranken den Bordet-Gengouschen Bacillus zu finden. Die 3 negativen Fälle stammten vom Ende des Stadium convulsivum (2 Fälle) und aus dem Stadium decrementi (1 Fall), 3—4 Wochen nach dem Beginn. Unter 77 zu kulturellen Untersuchungen herangezogenen Keuchhustenfällen gaben 68 ein positives Resultat. Bei ihnen war sämtlich auch die mikroskopische Untersuchung positiv gewesen.

Die Krankheitsperioden, wo ich Auswurf zur Aussaat auf das Blutagar genommen habe, waren ganz verschieden, vom 5. Krankheitstage bis zur 7. Krankheitswoche. Die Kultur wurde wenigstens einmal bei jedem Falle, bei einigen Fällen mehrmals unternommen. Nach

meiner Erfahrung ist der Bordet-Gengousche Bacillus gerade im Übergangsstadium vom katarrhalischen zum konvulsivischen, sowie am Anfang des letzteren, mit anderen Worten, also vom Ende der ersten Krankheitswoche bis zum Ende der zweiten Woche am häufigsten und am zahlreichsten fast in Reinkultur nachweisbar. Unter den 45 in den ersten 10 Krankheitstagen zu kulturellen Untersuchungen gelangten Fällen, sind nur 4 Fälle, unter den 60 in den ersten 14 Krankheitstagen untersuchten bloß 7 Fälle negativ ausgefallen. Gerade dem Zufall, daß ich die Patienten größtenteils in den ersten zwei Krankheitswochen treffen konnte, dürften meine so häufig positiven Resultate zu verdanken sein, obgleich mein Nährboden und meine Methodik zur Gewinnung des Auswurfes auch natürlich dabei eine große Rolle spielen. Der Grund, daß der Bacillennachweis in 9 von meinen Fällen mißlungen ist, besteht teils darin, daß ich in 5 Fällen den zur bakteriellen Untersuchung günstigen Auswurf nicht gewinnen konnte, teils (in 4 Fällen) in der zu weit vorgerückten Periode des konvulsivischen Stadiums.

Das erklärt sich daraus, weil die Ausstrichpräparate im ersten Falle trotz der Untersuchungen in den ersten zwei Krankheitswochen neben geringer oder etwas größerer Zahl des betreffenden Bacillus, eine Unzahl von anderen verschiedenen Bakterien zeigten, und weil im letzten Falle je zweimalige Untersuchungen sowohl in der Kultur als auch in dem Ausstrich auf das gänzliche Fehlen des Bordet- und Gengou-Bazillus hingewiesen haben. Jedoch konnte ich auch in ziemlich späten Krankheitsstadien diesen Bacillus mehrmals isolieren, selbst nach einem oder anderthalb Monaten von dem Krankheitsbeginn, wenn sie nur noch im konvulsivischen Stadium geblieben sind. Im allgemeinen kann ich sagen, daß man diesen Bacillus im günstigsten Falle für das Gewinnen des Auswurfes gewöhnlich in der dritten Krankheitswoche nicht schwer isolieren kann, also sind 12 Fälle unter meinen 16 Fällen, wo ich erst in der dritten Krankheitswoche zu kultivieren Gelegenheit hatte, positiv ausgefallen.

Zu gleicher Zeit habe ich auch in 18 Fällen von verschiedenen Respirationskrankheiten, bei denen ich nach der Beobachtung von der erforderlichen Zeitdauer klinisch sicher Keuchhusten ausschließen konnte, nach diesem Bacillus im Ausstrich sowie in der Kultur mich zu suchen bemüht, ohne aber eine Spur desselben herausfinden zu können. Diese Fälle waren Angina, Bronchitis, Tracheitis und katarrhalische Pneumonie.

Hier muß ich noch nebenbei bemerken, daß ich auch mehrmals influenzaähnliche Bacillen, Arten von Pseudodiphtheriebacillen und Kokkenarten im Sputum der Keuchhustenkranken gesehen habe, welche aber noch häufiger in anderen Erkrankungen des Respirationstractus zu bemerken waren.

III. Eigenschaften des Bordet-Gengouschen Bacillus.

Über die charakteristischen Merkmale des Bordet - Gengouschen Bacillus brauche ich nicht besonders zu schreiben, weil alle Eigenschaften meines Bacillus mit der Bordet-Gengouschen Angabe coinziidierten. Dieser Bacillus ist nach meinem gleichzeitigen Vergleich des Keuchhusten- und Influenzabacillus an verschiedenen Stämmen so eigentümlich, daß er sich auf gefärbten Ausstrichpräparaten mit erfahrenen Augen meistens vom Influenzabacillus unterscheiden läßt; also ist der erste deutlich plump, gedrunken und etwas größer als der schlankere, dünnere Influenzabacillus. Die Polfärbung gelang mir nicht immer, sondern nur im günstigen Falle, wenn auch meine Vorgänger, namentlich Klimenko, Finizio darauf großes Gewicht zur Unterscheidung der beiden Bakterienarten zu legen glauben. Nach mehreren Generationen auf Blutnährböden zeigt der Influenzabacillus auffallenden Pleomorphismus, während der Bordet - Gengousche Bacillus dagegen außer merklicher Größenverschiedenheit des einzelnen Wesens relativ konstante Form beibehält.

Da aber nur die mikroskopische Untersuchung der Ausstrichpräparate nicht für absolut sichere Diagnose der beiden gramnegativen Bakterien ausreicht, muß man sich weiter mit der Kultur beschäftigen.

Um richtige Orientierung der winzig kleinen, runden, stark gewölbten Kolonie dieses Bacillus zu bekommen, bedarf es bei der ersten Aussaat auf dem Blutagar gewöhnlich zweitägigen Bleibens im Brutofen, trotzdem konnte ich auf meinem Blutagar bei günstigen Fällen, d. h. relativ geringer Überwucherung anderer Mikroorganismen, schon 30 Stunden nach der Aussaat diese äußerst feinen, wie gestäubt aussehenden Kolonien mit unbewaffneten Augen gut erkennen. Je weiter diese Kultur auf den neuen Nährboden übertragen wird, desto besser wächst dieser Bacillus und bietet längs des Ausstriches ziemlich dichten, weißen oder grauen Belag mit scharf geschnittenen Rändern dar. Die Kultur des Influenzabacillus behält dagegen immer sogar nach jahrelangem Bestehen auf den Blutagarnährböden ihr zartes, weniger dichtes, mehr bläuliches Aussehen bei. Im Gegensatz zum Influenzabacillus wird der Bordet - Gengou - Bacillus auch auf Ascitesagar von der Blutagarkultur übertragen und wächst darauf ziemlich üppig. Auf gewöhnlichem Agar konnte ich den Bordet - Gengouschen Bacillus auch bei einigen Stämmen nach vollkommenem Gewöhnen auf diesen künstlichen Nährböden kultivieren, er ist aber nicht so üppig wie auf Blut- oder Ascitesagar gewachsen.

Der am besten geeignete Nährboden ist, wie oben geschildert, der Shigasche Nährboden. In bezug auf flüssigen Nährboden ist die Blut-Glycerinbouillon von Bordet und Gengou ausgezeichnet. Dennoch habe ich diesen Bacillus in einfacher Blutbouillon (2 ccm defibriniertes Ziegenblut in 10 ccm gewöhnlicher schwach alkalischer Bouillon) gut gezüchtet, daß der Bacillus durch täglich einmaliges Schütteln des Reagensglases, um Hinzutritt der Luft in den Nährboden zu schaffen, sogar 40 Tage lang in ein und demselben Nährboden sein Leben erhalten konnte.

IV. Übertragungsversuche von Keuchhusten auf Tiere mittels der Reinkultur des Bordet-Gengouschen Bacillus.

Zum Tierversuch habe ich zuerst 4 junge Hündchen, gerade am Ende des ersten Lebensmonats, gewählt. Die dazu benutzte mehrmals überimpfte Kultur stammte natürlich aus dem Sputum eines an typischem Keuchhusten leidenden, 2 Monate alten Säuglings, wurde im katarrhischen Stadium, ungefähr am 10. Krankheitstage isoliert und hat bis zu diesem Versuch etwa $1\frac{1}{2}$ Monate auf dem Blutagar bestanden.

Erstes Hündchen: 2 Röhren von 24stündiger Kultur auf meinem Blutagar, in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt; sofort am Rachen bepinselt.

Zweites Hündchen: die gleich wie oben hergestellte Bacillenemulsion unter der vorbereitet bloßgelegten Trachealwand in den Trachealraum eingespritzt.

Drittes Hündchen: als Kontrolle wurde ganz einfach 1 ccm physiologische Kochsalzlösung in den Trachealraum eingespritzt.

Viertes Hündchen: als Kontrolle ohne Eingriff.

Alle Tiere standen 20 Tage lang mit täglich einmaligem Wiegen des Körpergewichts und täglich dreimaligen Messungen der Analtemperatur unter vorsichtiger Beobachtung. Das erste Tier hat am ersten und zweiten Tage des Versuches fortwährend geschrien und schlecht getrunken, aber darnach sah es allmählich besser aus, und am 5. Tage war es ganz wohl wie vorher. Das Körpergewicht hat bei den ersten beiden Tieren und auch bei dem dritten in den ersten Tagen etwas abgenommen, indessen haben sie nach einer Woche wieder ihr Anfangsgewicht erreicht und täglich weiter zugenommen. Die Körpertemperatur blieb bei allen Tieren ganz normal, nämlich immer dieselbe wie die 10 Tage lang vor dem Versuche gemessene. Sonst konnte ich keine Spur von Husten bei den Tieren konstatieren.

Bei einem jungen Affengelang es mir aber ganz typischen Keuchhusten zu erzeugen. Dieser Affe, ein japanisches Rotgesicht Makako (*Macacus speciosus* F. cuv.) war kaum 10 Monate alt, wog 2400.0 g. Vor dem Ver-

suche mußte man 2 Wochen verwenden, um den Gesundheitszustand desselben genau kennen zu lernen. Ich brauchte in diesem Falle einen anderen frischeren Bakterienstamm als bei dem vorigen, welcher 12 Tage vor dem Versuche aus dem Sputum eines typisch keuchhustenkranke, 3 Monate alten Säuglings am 3. Krankheitstage isoliert und viermal auf meinen Nährboden übertragen wurde.

22. Juli 1911: Mit der Emulsion, welche aus 1 Öse von 48stündiger Kultur in physiologischer Kochsalzlösung besteht, betupfe ich die Rachenwand dieses Affen.

25. Juli: Zeitweise am Morgen und Abend ganz leichter Husten, der aber bald nach einem Tage spontan nachgelassen.

4. August: Erst mäßig starker Husten mehrmals täglich.

6. August: Jetzt Husten krampfhaft, anfallsweise, zirka alle 5 Minuten 2—3 mal. Dieser Hustenanfall besteht aus ca. 5—10 hintereinander folgenden kurzen Hustenstößen, nicht bellend, sondern von hohem Klang begleitet, und erinnert sehr genau an den Keuchhusten bei Menschen. Reprise fehlt aber. Er krümmt sich beim Hustenanfalle, sieht sehr qualvoll aus.

9. August: Aushusten des Sputums und Erbrechen kommen meistens am Ende des Anfalls vor, welcher durch Essen oder körperliche Anstrengungen leicht hervorgerufen wird. Er ißt nicht mehr gern.

12. August: Der Bordet- und Gengou-Bazillus aus dem Rachenschleim sowohl in den Ausstrichpräparaten als auch in den Kulturen reichlich nachgewiesen.

16. August: Der Bordet- und Gengou-Bazillus aus der erbrochenen Schleimmasse isoliert.

20. August: Er hustet noch immer, magert deutlich ab, sieht nicht lustig aus.

28. August: Unverändert.

30. August: Husten etwas erleichtert; Erbrechen ebenso, kommt aber noch mehrmals vor.

1. September: Husten jetzt nur am Morgen und in der Nacht, und viel leichter. Kein Erbrechen mehr. Appetit besser.

3. September: Die Kultur des Bazillus aus der ausgehusteten Schleimmasse mit gutem Erfolge.

11. September: Hustenanfall nur bei angestrengten Körperbewegungen, besteht aber noch aus 6—7 hintereinander kommenden Hustenstößen, nicht von quälendem Aussehen begleitet. Appetit fast wie vorher. Er springt lustig wie gewöhnlich umher.

17. September: Husten täglich nur einige Male. Er scheint jetzt ganz wohl.

21. September: Blutentnahme zum Zweck des Komplementbindungsverfahrens.

Die Incubationsdauer betrug also in diesem Falle 13 Tage; das katarrhalische Stadium nur 2. Das konvulsivische Stadium dauerte ungefähr 23—25 Tage. Seither wurde der Husten spontan nach und nach leichter. Das Stadium decrementi betrug ca. 18—20 Tage. Also betrug die ganze Hustendauer ca. 45 Tage. Während der ganzen Krankheitsdauer wurde kein merkliches Fieber konstatiert.

Um von dem Wesen dieses Hustens noch eingehend Kenntnis zu bekommen, habe ich zuerst unternommen, Komplementbindungsreaktion des Serums dieses Affen mit dem zum Versuch angewendeten Bordet-Gengouschen Bacillus auszuführen. Es war aber umsonst. Ich habe nach meinen wiederholten Untersuchungen über den Hemmungstiter dieses Affenserums auf hämolytisches System gefunden, der Hemmungstiter war so niedrig, daß das Serum erst bei Zusatz von 0.001 cem ab die Wirkung des hämolytischen Systems entfalten ließ und solch geringer Zusatz des Serums kein charakteristisches Komplement-Ablenkungsvermögen zu äußern ausreichte. Da habe ich einen anderen, ganz gesunden, aber noch jüngeren Affen im Alter des 6. Lebensmonates (K. G. 1030.0 g) und noch einen alten gesunden Affen (K. G. ca 4 kg) zum Vergleich genommen, welche beide gleichfalls zur Gattung des japanischen Makako gehörten. Nach meinen wiederholten Bestimmungen war die Hemmungsstärke der beiden Tiersera auf hämolytisches System verschieden, d. h. die des gesunden jüngsten noch stärker als die des ersten kranken, und die des gesunden ältesten viel schwächer als die des kranken.

Daraus könnte man vielleicht schließen, daß, je jünger ein Affe ist,

Tabelle über die Bestimmung des Hemmungstiters der Affensera auf hämolytisches System.

Nr.	Die zum hämolytischen System zugesetzte Serummenge	Resultat		
		bei dem alten gesunden Affen	bei dem jungen kranken Affen	bei dem jüngsten gesunden Affen
1.	0.6	k	H	H
2.	0.4	FcL	H	H
3.	0.2	L	H	H
4.	0.1	L	H	H
5.	0.05	L	FcH	H
6.	0.025	L	K	FcH
7.	0.01	L	K	FcH
8.	0.005	L	k	K
9.	0.0025	L	FcL	k
10.	0.001	L	L	FcL
11.	0.0005	L	L	L
12.	0.00025	L	L	L

Bemerkungen:

H = komplette Hemmung, k = kleine Kuppe,
 FcH = fast komplette Hemmung, FcL = fast komplette Lösung,
 K = große Kuppe, L = komplette Lösung.

desto mehr das Serum desselben den Hemmungsstoff auf ein bestimmtes hämolytisches System enthält.

Der Hemmungsstoff ist beim jungen Affen so reichlich, daß es nicht wunder nehmen wird, daß ich beim Komplementablenkungsversuche mit Serum der 3 Affen und mit einigen Stämmen vom Bordet-Gengouschen Bacillus, auch mit dem vom Affen isolierten Stamme, negative Resultate erheben mußte.

Die Untersuchung mußte deshalb noch einen anderen Weg einschlagen.

Nachdem ich die Identität des vom Affensputum isolierten Bacillus mit anderen Bordet-Gengouschen Bacillenstämmen und den Unterschied desselben von einigen Influenzabacillenstämmen kulturell gesichert hatte, entschloß ich mich, den Bacillus durch Komplementbindungsverfahren mit 5 Arten von Kaninchensera, welche mit 5 verschiedenen Stämmen von Bordet-Gengouschen Bacillus immunisiert waren, noch weiter zu bestimmen.

Als hämolytischen Ambozeptor verwendete ich solches inaktiviertes Serum (hämolytischer Titer 0.001 ccm) des gesunden Kaninchens, welches im Intervall von je 5 Tagen durch fünfmalige intravenöse Injektionen von mit physiologischer Kochsalzlösung mehrmals gewaschenen, frischen, defibrinierten Ziegenblutkörperchen in steigender Dosis immunisiert wurde, als Blutkörperchenaufschwemmung eine 5% Aufschwemmung von oben angegebenen Ziegenblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung, und als Komplement frisches Meerschweinchen-serum in Verdünnung von 10% mit physiologischer Kochsalzlösung. Fünf Arten von inaktivierten Immunsereen habe ich an fünf gesunden Kaninchen durch mehrmalige (über 10 mal) intraabdominelle Injektionen von 48stündigen Kulturen des Bordet- und Gengou-Bacillus (5 Stämme) in steigender Dosis gewonnen.

Der Hemmungstiter dieser Sera auf hämolytisches System war 0.3 ccm und die zur Reaktion gebrauchte höchste Dosis derselben in allen Fällen 0.05 ccm. Um Antigen herzustellen, habe ich Bacillenaufschwemmung von 3 Ösen von 48stündigen Kulturen in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung mittels Schüttelapparates täglich einmal je 1—2 Stunden lang, 2 Tage behandelt und danach durch Zentrifugieren klaren Bakterienextrakt erhalten. Dadurch wurden insgesamt 10 Arten von Antigen aus verschiedenen Bacillenstämmen gewonnen, worunter ich auch den beim letzten Male vom Affen isolierten Stamm mitgezählt habe. Da der Hemmungstiter dieser Antigene je nach der Art derselben auf 0,2—0,3 ccm stand und diese Antigene allein keine hämolytische Wirkung herbeiführten, wurde 0,1 ccm in allen Versuchen verwendet. Nachdem diese Vorbereitungen in Ordnung waren, habe ich Komplementbindungsverfahren ausgeführt, und zwar an fünf verschiedenen Kaninchenimmunsere mit zehn verschiedenen Antigenen in mannigfaltiger Kombination.

Auf Immunsere von wechselnden Dosen, aber von derselben Art, in 8 Röhren verteilt, wurden von einem Antigene je 0,1 ccm und 10% Komplementver-

dünnung in Dosen von je 0.5 ccm zugesetzt, jedem Röhrechen wurde physiologische Kochsalzlösung auf 1,5 ccm zugefügt; sämtliche Röhrechen wurden gut geschüttelt, 1 Stunde lang im Brutofen bei 37° C stehen gelassen; dann kamen in jedes Röhrechen 0,5 ccm 200fach verdünntes hämolytisches Serum und 0,5 ccm 5% Ziegenblutkörperchenaufschwemmung. Nachdem alle Röhrechen nach dem Schütteln nochmals im Brutofen 2 Stunden gestanden hatten, wurden sie in den Eisschrank gebracht, wo sie bis zum nächsten Tage verweilten. Alle erforderlichen Kontrollproben wurden gleichzeitig berücksichtigt.

Diese bezüglichlichen Versuche haben ausnahmslos immer dieselben Resultate hervorgebracht, durch welche man genügenden Beweis hat, daß mein vom Affen isolierter Bacillus kein anderer als der Bordet-Gengousche Bacillus ist. Es wäre wohl überflüssig, wenn ich hier alle Versuchsgänge und Resultate, außer der unten stehenden Übersichtstabelle, im einzelnen aufstelle.

Tabelle der Komplementbindungsreaktion.

Nr.	Antiserum	Resultat									
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
1.	0.05	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
2.	0.025	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
3.	0.01	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
4.	0.005	FcH	FcH	K	FcH	H	FcH	FcH	FcH	K	FcH
5.	0.0025	K	K	K	K	K	K	K	K	k	K
6.	0.001	k	k	k	k	k	k	FcL	k	k	k
7.	0.0005	L	L	L	L	L	k	L	L	L	L
8.	0.00025	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Bemerkung: a = Antigen aus dem vom Affen isolierten Bacillenstamm,
 b = Antigen aus dem zum Übertragungsversuche auf den Affen benutzten Bacillenstamm,
 c, d, e, f, g, h, i, j = Antigen aus den von verschiedenen Keuchhustenkranken isolierten Bazillenstämmen.

Zum Schluß muß ich noch einmal betonen, daß ich in meinem Übertragungsversuche auf den Affen den Borget-Gengouschen Bacillus sogar im vorgerückten Stadium der experimentellen Krankheit aus dem Sputum kulturell nachweisen konnte, nämlich am Anfang des Stadium decrementi oder am 42. Tage nach der Bepinselung des Rachens. Diese Tatsache und jenes typische Krankheitsbild beweisen genügend, daß der kulturell sowie biologisch nachgewiesene Bordet-Gengousche Bacillus in diesem Falle als Krankheitserreger des Affenkeuchhustens angenommen werden kann, weil es kaum denkbar ist, daß der bisher ganz fremde Bacillus von Anfang an so lange harmlos im Körper sich am Leben erhalten könnte.

Zusammenfassung.

1. Mikroskopisch wurde unter 81 untersuchten Keuchhustenfällen der Bordet-Gengousche Bacillus 78 mal gefunden; negativ waren dabei nur drei Untersuchungen in spätem Stadium.

2. Kulturell wurde derselbe Bacillus unter 77 untersuchten Keuchhustenfällen 68 mal nachgewiesen, das ist in 88%. Bei den innerhalb der ersten 14 Krankheitstage untersuchten 45 Fällen sogar 41 mal, also in 91%.

3. Bei kulturellen Untersuchungen von 18 Fällen andersartiger Respirationskrankheiten fand ich den Bacillus niemals.

4. Zur Isolierung des Bordet-Gengouschen Bacillus aus dem Sputum ist mein Nährboden am geeignetsten; dagegen zur Erzeugung größerer Mengen von Kultur ist der Shigasche Nährboden am besten zu empfehlen.

5. Die Unterscheidung des Bordet-Gengouschen Bacillus vom Influenzabacillus ist im Ausstrichpräparate nicht immer, aber in der Kultur stets leicht und deutlich auszuführen.

6. Ein Übertragungsversuch des Keuchhustens auf einen jungen japanischen Affen ist mir mit Reinkultur des Bordet-Gengouschen Bacillus einwandfrei gelungen.

Literaturverzeichnis.

1. Bordet et Gengou, Ann. de l'Institut. Past. **20**. 1906.
 2. — — Ebenda **21**. 1907.
 3. — — Compt. rend. de la soc. de Biolog. de Paris **2**. 1907.
 4. Klimenko, Deutsche med. Wochenschr. 1908.
 5. — Centralbl. f. Bakt., Orig.-Bd. **46**. 1908.
 6. — Ebenda, Orig.-Bd. **48**. 1909.
 7. Arnheim, Berl. klin. Wochenschr. 1908.
 8. — Arch. f. Kinderh. **50**. 1909.
 9. Fränkel, Münchn. med. Wochenschr. 1908.
 10. Shiga, Saikingakuzassi. 1908.
 11. — Ebenda. 1910.
 12. Casagrandi, Centralbl. f. Bakt., **41**. 1908.
 13. Seiffert, Münchn. med. Wochenschr. 1909.
 14. Wollstein, Journ. of exp. med., Vol. 11. 1909.
 15. Mentschikoff, Russkij Wratsch, 1909 (Referat in Centralbl. f. Kinderh. 1910).
 16. Delcourt, Arch. de med. des enfants. 1911.
 17. E. Savini & Th. Savini-Castano, Centralbl. f. Bakt., Orig.-Bd. **57**. 1911;
 18. Finizio, Zeitschr. f. Kinderh., Orig.-Bd. **3**. 1911.
-