

VI.

Experimente über die bacterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körpers.

Von

Dr. med. Geo. Nuttall
aus San Francisco.

(Hierzu Taf. IV.)

Metschnikoff hat in den letzten Jahren die Lehre zu begründen versucht, dass der Schutz des thierischen Körpers gegen Infectionskrankheiten und die Ausbildung der erworbenen Immunität zu Stande komme durch die Thätigkeit von Phagocyten, d. h. von Zellen, welche die eindringenden Bacterien aufnehmen (fressen) und vernichten.

Die experimentellen Arbeiten, durch welche Metschnikoff seine Theorie gestützt hat, bestehen (wenn wir von den Beobachtungen an Daphnien absehen) wesentlich in Versuchen mit Milzbrandbacillen an Fröschen und Kaninchen sowie in Untersuchungen über das gegenseitige Verhalten von Milzbrandbacillen und Leukocyten verschiedener Thiere ausserhalb des Körpers auf dem heizbaren Objecttische.

Bei den Experimenten am Frosch fand Metschnikoff, dass Stücke von Organen, die an Milzbrand verendeten Thieren entnommen waren, nachdem dieselben einige Tage unter der Haut eines lebenden Frosches gelegen hatten, keine lebenden Milzbrandbacillen mehr enthielten. Die Stücke waren alsdann in keiner Weise mehr virulent gegenüber empfänglichen Thieren. Die mikroskopische Untersuchung ergab stets in der Peripherie des Stückes zahlreiche Leukocyten, und in diesen fanden sich die Milzbrandbacillen, die grossentheils degenerirt und abgestorben erschienen.

Die Warmblüterversuche wurden an Kaninchen angestellt. Metschnikoff brachte in Glasröhrchen enthaltene Cultur von abgeschwächten Milzbrandbacillen unter die Haut des Ohres der Versuchsthiere, zerbrach

dann die Röhren und konnte nun durch mikroskopische Präparate constatiren, dass der entstehende Eiter massenhaft Leukocyten enthielt, welche Milzbrandbacillen aufgenommen hatten. Virulente Bacillen wurden bei empfänglichen Thieren nicht aufgenommen; dagegen in reichlicher Menge bei immunen Thieren.

Ebenso gelang es Metschnikoff durch directe Beobachtung auf dem heizbaren Objecttisch die Aufnahme der Milzbrandbacillen durch Leukocyten und ihre Vernichtung in den Zellen zu erweisen.

Alle diese scheinbar in übereinstimmender Weise für die Bedeutung der Phagocyten sprechenden Versuche lassen nun aber eine Reihe von Einwänden zu, welche in der nebenstehend abgedruckten Arbeit Dr. Bitter's ausführlich dargelegt sind. Ich hebe aus denselben nur den schwerwiegendsten hervor, der darin besteht, dass bis jetzt noch nicht festgestellt wurde, dass die Aufnahme der Bacillen im lebenskräftigen Zustande durch die Phagocyten erfolgt, während doch entschieden dieser Beweis geliefert werden muss, ehe man die Rolle der Phagocyten als eine den Körper gegen Infectionserreger schützende anerkennen kann.

Angesichts der grossen Bedeutung der Frage nach der Ursache der erworbenen Immunität einerseits, der noch mangelhaften Beweisführung Metschnikoff's andererseits, erschien eine Nachprüfung der Metschnikoff'schen Resultate dringend wünschenswerth, und ich habe daher gern der Aufforderung des Herrn Prof. Flügge, jene Experimente zu wiederholen, Folge gegeben.

Vor Allem lag mir daran, festzustellen, ob die Phagocyten thatsächlich lebende Bacillen aufnehmen, und ob sie es allein sind, welche zur Bacillenvernichtung befähigt sind. Stellte es sich heraus, dass die Aufnahme in die Zellen nur auf einen gewissen Bruchtheil der Bacillen beschränkt ist, dass dagegen ein weiterer Bruchtheil ohne Berührung mit den Zellen durch irgend welche andere Einflüsse des lebenden Körpers zu Grunde geht, so muss die functionelle Bedeutung der Phagocyten zweifelhaft werden und es ist dann sogar möglich, dass sie nur zur Aufnahme solcher Bacillen befähigt sind, die bereits in Folge anderer Einflüsse degenerirt waren.

Zunächst habe ich die Metschnikoff'schen Experimente am Frosch wiederholt; dann stellte ich einige vergleichende Versuche mit abgeschwächten und virulenten Milzbrandbacillen am Kaninchenohr an; schliesslich habe ich in grösserer Ausdehnung die Beobachtungen über die Beziehungen zwischen Leukocyten und Bacillen auf dem heizbaren Objecttisch controlirt.

Die Versuche wurden grösstentheils im Winter 1886/87 in Göttingen, einige Ergänzungen im Anfang des Winters 1887/88 in Breslau ausgeführt.

I. Versuche an Fröschen.

A. Versuchsanordnung.

Kleine, etwa halblinsengrosse Stückchen Lunge von eben an virulentem Milzbrand gestorbenen Mäusen wurden Fröschen unter die Haut des Rückens gebracht und dort verschieden lange Zeit belassen. Die Einbringung der Stückchen geschah in einer Reihe der Fälle (Tab. I) möglichst aseptisch. In einer anderen Reihe (Tab. II) unterblieb die Desinfection der Haut der Versuchsthiere.

Die in der angegebenen Weise geimpften Frösche wurden bei einer Temperatur gehalten, die Tages über ungefähr 16° C. betrug und Nachts nicht unter 10° C. herunterging.

Nachdem das Impfstück verschieden lange Zeit unter der Haut der Thiere verweilt hatte, wurde es herausgenommen und zur mikroskopischen Untersuchung verwendet. Dasselbe hatte schon nach wenigen Tagen seine natürliche Farbe verloren und war von einem gallertigen, graugelben Exsudate umgeben und durchsetzt. Von diesem Exsudate wurden die Präparate zur weiteren Untersuchung angefertigt. Eine geringe Menge desselben wurde auf dem Objectträger mit einem Tropfen sterilisirter physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Darauf wurde ein Deckglas aufgelegt und dasselbe, um ein Austrocknen des Präparates zu verhüten, mit einem Paraffinringe umzogen. Diese Präparate gestatten eine lange dauernde Untersuchung und haben den Vortheil, dass auch die Leukocyten in ihnen längere Zeit ihre Beweglichkeit bewahren, so dass man ein eventuelles Aufgenommenwerden der Bacillen sehr gut beobachten kann. Zugleich wurden immer noch einige Trockenpräparate in gewöhnlicher Weise angefertigt, mit Methylenblau gefärbt und nach Einlegung in Canadabalsam untersucht. Derartige vorsichtig angefertigte Präparate schädigen, entgegen den Angaben von Metschnikoff, nach meinen Erfahrungen weder die Bacillen noch die Leukocyten in irgendwie erheblicher Weise in ihren Formverhältnissen.

Der Rest des Impfstückes wurde theils zur Anlage von Plattenculturen, theils zur Impfung von Mäusen verwendet.

B. Versuchsergebnisse.

In den aus dem Impfstück hergestellten Präparaten fanden sich in allen Fällen sehr reichlich Leukocyten mit vielfachem oder gelapptem Kern und ausserdem Zellen mit einem grossen blassen Kern. In den frischen Präparaten zeigte ein grosser Theil derselben amöboide Bewegung. Um über das Procent-Verhältniss zwischen eventuell aufgenommenen und nicht aufgenommenen Bacillen in den Präparaten einigermaassen genaue Anhaltspunkte zu erhalten, wurden Zählungen versucht. Dieselben geschahen in der Weise, dass in mehreren aufeinanderfolgenden Gesichtsfeldern die vorhandenen Bacillen gezählt wurden, bis die Zahl 200 erreicht war. Dabei wurde notirt, wie viel von diesen 200 Bacillen frei, wie viel in Zellen lagen. Diese Zählungen wurden an verschiedenen Stellen des Präparates einige Male wiederholt und aus den so gewonnenen Resultaten das Mittel genommen.

Tabelle I.
Versuche mit Frischen und virulenten Milzbrandbacillen bei 10 bis 16° C.

Vers.-Nr.	Das Impfstück wird untersucht nach:	Mikroskopischer Befund an der Impfstelle	Ergebniss der Plattencultur	Die vom Impfstück geimpften Mäuse sterben nach:
5	15 Stunden	Ziemlich viele Leukocyten. Bacillen zum allergrössten Theil frei und fast sämmtlich von normalem Aussehen.	Einige Saprophyten.	28 Std. B nach 23 Std.
6	15 „	desgl.	Nur Milzbrandcolonieen.	36 „ B „ 12 „
7	16 „	desgl.	„	26 „ „ „
21	22 „	Bacillen theilweise degenerirt, sowohl freie wie in Leukocyten liegende. 27 Procent der Bacillen in Leukocyten.	„	49 „ „
17	40 „	Bacillen meistens normal. Keine Aufnahme durch Leukocyten.	„	26 „ „
18	42 „	Involutionsformen sehr häufig. Doch gleichmässig bei freien und aufgenommenen Bacillen; 28 Procent Bacillen in Leukocyten.	„	21 „ „
19	47 „	Bacillen meistens stark involvirt. Etwa 38 Procent der Bacillen in Leukocyten. Viele freie Bacillen stark degenerirt.	„	38 „ B „ 20 „
20	72 „	Bacillen sehr stark degenerirt; 31 Procent in Leukocyten.	Fast nur Saprophyten.	40 „ „
8	89 „	Wenige Bacillen. In Leukocyten konnten keine gefunden werden. Viele Saprophyten.	Nur Milzbrandcolonieen.	50—60 Std.
23	91½ „	Bacillen sehr stark degenerirt, sowohl frei, wie in Leukocyten. 63 Procent Bacillen in Leukocyten.	„	46 Std.
13	100 „	Freie und in Leukocyten liegende Bacillen stark degenerirt. Wenige Bacillen.	„	7 Tag. B nach 23 Std.
24	114½ „	Wenige Bacillen Fast alle stark involvirt. 38 Proc. in Leukocyten.	„	60 Std. B „ 23 „
14	7 Tagen	Alle Bacillen degenerirt, z. Th. in Leukocyten.	„	60 Std. B „ 23 „
15	10 „	Sehr wenige Bacillen. Alle involvirt. z. Th. in Leukocyten.	Einige Saprophyten, wenige Milzbrandcolon.	60 „ B „ 23 „
16	13 „	Sehr wenige Bacillen. Alle stark involvirt. z. Th. in Leukocyten.	Keine Milzbrandcolonieen	60 „ B „ 23 „

G. NUTTALL:

Tabelle II.
Versuche mit Fröschen. Temperatur 10 bis 16° C.

Verg.-Nr.	Das Impfstück wurde untersucht nach:	Mikroskopischer Befund	Ergebniss der Plattencultur	Die vom Impfstück geimpften Mäuse sterben nach:
35	20 1/2 Stunden	Ziemlich viel Leukocyten. Wenig involvirte Bacillen. 1 Procent Bacillen in Leukocyten.		23 Stunden
36	47 1/2 "	Involutionsformen häufiger. Zum grossen Theile frei. 41 Procent der Bacillen in Leukocyten.		24 1/2 "
37	70 1/2 "	Die meisten Bacillen blass gefärbt. 80 Procent Bacillen in Leukocyten.		28 "
38	95 1/2 "	Weniger Bacillen. Häufig involvirte, freiliegend. 57 1/2 Procent Bacillen in Leukocyten.		
39	120 "	Desgleichen; 71 Procent Bacillen in Leukocyten.		30--36 "
40	7 Tagen	Wenig Bacillen. Meist involvirt. 65 Procent Bacillen in Leukocyten.		25 1/2 "
41	10 "	Wenig Bacillen. Kaum noch normale. 70 Procent Bacillen in Leukocyten.		30--40 "
42	14 "	Kein normaler Bacillus. 30 Procent Bacillen in Leukocyten.	Keine Milzbrandcolonien viel Saprophyten.	Nicht gestorben
43	16 "	Mehrere lange Fäden stark involvirt und frei. In einigen Leukocyten stark degenerirte Bacillen.	Einige Milzbrandcolon.	23 1/4 Stunden
44	17 "	Freie degenerirte Bacillen, doch sehr selten. In Leukocyten waren keine Bacillen zu finden.	Einige Milzbrandcolon. und Saprophyten.	Nicht gest. Von einer Colonie geimpft todt nach 17 1/2 St. an Milzbr.

Die Aufnahme der Bacillen von Seiten der in das Impfstück eingewanderten Leukocyten scheint, wie die umstehenden Tabellen zeigen, ziemlich langsam vor sich zu gehen. Nach 16 stündigem Verweilen des Impfstückes unter der Froschhaut waren, trotz reichlichem Vorhandensein von Leukocyten, solche welche Bacillen enthielten, nicht aufzufinden. Metschnikoff behauptet allerdings schon nach 12 bis 15 Stunden reichlich bacillenhaltige Zellen angetroffen zu haben.

Dagegen hatte nach 22 Stunden schon eine ziemlich bedeutende Aufnahme stattgefunden. In einem Falle wurden 27 Procent aller vorhandenen Bacillen als in Zellen liegend constatirt, in andern allerdings nur 1 Procent.

Vom Ende des ersten Tages an scheint die Menge der aufgenommenen Bacillen allmählich zuzunehmen, bis bei etwa 90 bis 120 stündigem Verweilen des Impfstückes unter der Froschhaut 50 bis 70 Procent der vorhandenen Bacillen in den Leukocyten gefunden werden. Bis zum 10. Tage bleibt dieses Verhältniss annähernd dasselbe.

Dabei ist schon ziemlich früh zu constatiren, dass die absolute Zahl der Bacillen von Tag zu Tag mehr abnimmt. Schon am 3. oder 4. Tage macht sich diese Abnahme bemerkbar. Am 13. oder 14. Tage ist wegen der sehr geringen Menge der noch vorhandenen Bacillen die Schätzung des Verhältnisses zwischen freien und von Leukocyten aufgenommenen schon sehr schwierig. In den Leukocyten lagen in einem solchen Falle etwa 30 Procent. Am 16. Tage wurde von den sehr spärlich vorhandenen Bacillen keiner in den Leukocyten gefunden.

An den aufgenommenen Bacillen waren im Allgemeinen keinerlei stärkere Veränderungen zu constatiren, als an den freiliegenden Exemplaren. In den ersten zwei Tagen boten die meisten Bacillen noch das normale Aussehen dar und färbten sich mit Methylenblau auch gleichmässig intensiv. Nach etwa 42 Stunden waren häufiger Involutionsformen zu constatiren, die sich im ungefärbten Präparat durch kolbige und knotige Auftreibung und stellenweisen Zerfall der Stäbchen; im gefärbten Präparat, ausser durch die vorgenannten Merkmale, vorzugsweise dadurch charakterisirten, dass die betreffenden Stäbchen sich nicht wie gesunde Bacillen mit Methylenblau schön intensiv blau, sondern in einem schmutzigen mehr weniger violetten Tone färbten, der um so blasser wurde, je stärker die Degeneration ausgebildet war. Diese Veränderungen zeigten sich gleichmässig an freien Bacillen und solchen, die von Leukocyten aufgenommen waren. Erhebliche Unterschiede in der Schnelligkeit oder Intensität der Degeneration zwischen den aufgenommenen und freien Bacillen konnte ich nicht beobachten. Nur das steht fest, dass

Degenerationsformen in beiden Fällen um so häufiger werden, je länger das Impfstück unter der Froschhaut verweilt.

Die Menge der Involutionsformen nahm, wie schon hervorgehoben, von Tag zu Tag zu. Nach 78 Stunden färbte sich schon der grösste Theil der Bacillen ungemein blass, und waren kolbig und knotig aufgetriebene Formen bei weitem häufiger wie normale. Doch wurden auch nach 7 Tagen noch gut gefärbte und gut geformte Bacillen aufgefunden. Nach 13 Tagen waren unter den nur noch spärlich vorhandenen Bacillen wenige von normaler Form, keiner von normalem Färbungsvermögen mehr zu entdecken.

Da die Bacillen innerhalb und ausserhalb der Leukocyten gleichmässig degenerirten und die Menge der Involutionsformen in beiden Fällen mit der Zeit successive zunahm, so muss die Möglichkeit zugegeben werden, dass auch die von den Leukocyten aufgenommenen nicht sowohl der von Metschnikoff angenommenen intracellulären Verdauung zum Opfer fallen, sondern ebenso wie die freigebliebenen Bacillen in Folge irgend welcher noch unbekannter schädlicher Einflüsse absterben und zerfallen.

Saprophyten, an deren Betheiligung beim Zustandekommen der Degeneration der Milzbrandbacillen von vornherein sehr wohl gedacht werden konnte, waren anscheinend an dieser Schädigung der virulenten Bacterien unschuldig, da sie bei der ersten Versuchsreihe (s. Tab. I.) in den weit- aus meisten Fällen sowohl mikroskopisch als auch in den angelegten Platten vermisst wurden, und da hier Involutionsformen dennoch ebenso rasch und ebenso reichlich auftraten, wie in den Fällen, in denen Saprophyten neben den Milzbrandbacillen gefunden wurden.

Eine Abnahme oder ein Verlust der Virulenz der unter der Froschhaut dem Einfluss der Leukocyten preisgegebenen Bacillen findet sicher nicht statt, wie die kurzen Fristen beweisen, innerhalb welcher die geimpften Mäuse erlagen. In der ersten Versuchsreihe (Tab. I) starben zwar die Mäuse meistens bedeutend zu spät, was für eine Abschwächung zu sprechen schien. Doch war nur der Impfmodus hieran schuld. Es wurden nämlich kleine Partikelchen des Impfstückes den Mäusen direct unter die Haut gebracht. Hier gebrauchten offenbar die hauptsächlich im Innern des Stückes noch vorhandenen lebensfähigen Bacillen einige Zeit, um bis an die Oberfläche durchzuwachsen und die Infection zu bewirken. Als der Impfmodus geändert wurde (Injection einer Aufschwemmung des Impfstückes, Tabelle II), starben die meisten Mäuse zur rechten Zeit. In beiden Versuchsreihen starben die von den ersten Mäusen, mochten dieselben zu spät oder rechtzeitig gestorben sein, geimpften Mäuse (in den Tabellen mit B bezeichnet) regelmässig zwischen der 20. und 23. Stunde.

Da in neuerer Zeit wieder von Lubarsch (*Fortschr. d. Med.* 1888. Nr. 4) eine Abschwächung der Milzbrandbacillen unter der Froschhaut behauptet ist, glaube ich auf diese in zahlreichen Versuchen gewonnenen Resultate noch besonderen Nachdruck legen zu sollen.

Auch mit den auf den Gelatineplatten gewachsenen Colonieen wurden zu wiederholten Malen Infectionsversuche angestellt, welche ebenfalls bewiesen, dass eine Abnahme der Virulenz nicht stattgefunden hatte. So starb eine Maus, welche von einer Platte, die aus einem 16 Tage unter der Froschhaut gelegenen Impfstück hergestellt war und auf welcher nur noch wenige Colonieen sich entwickelt hatten, nach 17 $\frac{1}{2}$ Stunden an Milzbrand. Nach Lubarsch sollen aber die Culturen aus dem Impfstück vom 6. Tage an niemals mehr Mäuse tödten, also die Bacillen völlig abgeschwächt sein.

Als besonders beweisend sei noch folgender Versuch angeführt: Einem Frosch wurde ein kleines Stückchen Lunge einer milzbrandigen Maus, wie gewöhnlich, unter die Haut des Rückens gebracht. Nach 6 Tagen wurden aus dem Organstückchen und dem gallertigen Exsudat Plattenculturen angelegt. Es wuchsen reichlich Milzbrandcolonieen, doch untermischt mit einigen Saprophyten. Die Colonieen entwickelten sich in der für virulenten Milzbrand gewohnten Zeit zur normalen Grösse, so dass schon durch den Anblick der Platten eine Abschwächung auszuschiessen war. Von den kleinsten und kümmerlichsten Colonieen wurden drei Mäuse geimpft, von welchen zwei nach 18—20 Stunden, eine nach etwa 30 Stunden an Milzbrand starben. Eine von der letzten Maus geimpfte zweite starb nach ca. 20 Stunden an Milzbrand.

Dass nicht nach noch längerer Zeit sich unter den im Impfstück erhalten bleibenden Bacillen hier und da einige abgeschwächte vorfinden, will ich durchaus nicht für unmöglich erklären. Um aber die Abschwächung einzelner Bacillen überzeugend darzuthun, wird man sich unbedingt des Plattenverfahrens bedienen und die einzelnen gewachsenen Milzbrandcolonieen (denen man bei stärkerer Abschwächung wegen ihres kümmerlichen Wachstums schon fast ohne Weiteres die Abschwächung ansehen kann) durch Thier- und Culturversuche prüfen müssen. Bei directer Anlage von Stich- oder Strichculturen und nachfolgender Züchtung bei hoher Temperatur, wie Lubarsch dieselbe angewendet hat, ist wegen der grossen Gefahr der Verunreinigung durch rasch wachsende Saprophyten, sowie auch wegen des rascheren Wachsens und Ueberwucherns der nicht abgeschwächten Milzbrandbacillen ein exacter Nachweis der erfolgten Abschwächung gewiss nicht zu erbringen.

Die Behauptung von Metschnikoff, dass die Virulenz der im Impfstück enthaltenen Bacillen zwischen dem 3. und 5. Tage verloren geht, ist somit als nicht zutreffend erwiesen. Noch nach 16 bis 17 Tagen waren virulente Milzbrandbacillen in den Impfstücken vorhanden. Es wird natürlich die Grösse des unter die Froschhaut gebrachten Organstückes auf die längere oder kürzere Lebensdauer der Bacillen im Innern desselben von Einfluss sein. In einem grösseren Stück werden sich länger lebensfähige Bacillen erhalten, als in einem kleinen, da die Vernichtung der Bacillen bedingenden schädlichen Einflüsse im ersten Falle langsamer in das Innere des Stückes vordringen werden. Um so sorgfältiger

habe ich darauf geachtet, die Impfstücke möglichst klein und nicht umfangreicher, als Metschnikoff sie benutzt hat, zu wählen. Die Differenz unserer Resultate ist vielmehr wohl auf die Unterschiede in der Methodik zurückzuführen, indem der von mir eingeschlagene Impfmodus und die Cultur in Platten in zuverlässigerer Weise über das Vorhandensein lebensfähiger Bacillen zu entscheiden vermochte.

Tabelle III.

Versuche mit Sommerfröschen u. virulenten Milzbrandbacillen bei 17—22° C.

Vers.-Nr.	Das Impfstück wird untersucht nach:	Mikroskopischer Befund an der Impfstelle	Ergebniss der Plattencultur	Die vom Impfstück geimpften Mäuse sterben nach
95	1 Tag	Geringe Aufnahme durch Leukocyten		Alle Mäuse starben zur gewöhnlichen Zeit (20 bis 24 Stunden) an Milzbrand.
96	4 Tagen	Allmähliche Abnahme der Bacillen. Degeneration in gleichem Maasse an den freien und aufgenommenen Bacillen	Nur Milzbrandcolon.	
97	6 „			
98	7 „			
99	8 „			
100	14 „	Bacillen fast sämtlich involvirt	Nur Milzbrandcolon.	

Tabelle IV.

Versuche mit Fröschen und 18 Tage abgeschwächten Milzbrandbacillen bei 10 bis 16° C.

Vers.-Nr.	Das Impfstück wird untersucht nach:	Mikroskopischer Befund an der Impfstelle	Ergebniss der Plattencultur	Die vom Impfstück geimpften Mäuse sterben nach:
80	26 Stunden	Bacillen frei. Meist gut erhalten.	Nur Milzbrandcolon.	
89	47 „	Bacillen grössten Theils involvirt. Ein grosser Theil in Leukocyten.	Fast nur Milzbrandcolonieen.	68 Stunden
90	50 „	Bacillen theils frei, theils in Leukocyten.		
91	84 „	Bacillen meistens involvirt. z. Th. in Leukocyten.	Fast nur Milzbrandcolonieen.	40 „
92	91 „	desgl.		84 „
93	5 Tagen	desgl.	Fast nur Milzbrandcolonieen.	40—46 Std.
94	7 „	desgl.		4 Tagen

Tabelle V.

Versuche mit Fröschen und virulenten Milzbrandbacillen bei 23° C.

Vers.-Nr.	Das Impfstück wird untersucht nach:	Mikroskopischer Befund an der Impfstelle	Ergebniss der Platten-cultur	Die vom Impfstück geimpften Mäuse sterben nach:
26	23 Stunden	(Frosch todt). Die Bacillen an der Impfstelle zu langen Fäden ausgewachsen. In Herzblut u. Leber keine Milzbrandbacillen.	—	—
27	23 „	(Frosch todt). Saprophyten an der Impfstelle. Milzbrandbacillen zu langen Fäden ausgewachsen, von normalem Aussehen. Selten Aufnahme durch Leukocyten.	—	—
28	23 „	(Frosch todt). Wie vorher. In Herzblut und Leber einige kurze Milzbrandbacillen.	—	—
25	24 „	(Frosch lebendig). Milzbrandbacillen zu langen Fäden ausgewachsen. Wenig Saprophyten. 2 Proc. der Bac. in Leukocyten.	—	24 ³ / ₄ Std.
29	48 „	(Frosch lebendig). Etwa 27 Procent der Bacillen in Leukocyten.	—	27 „
32	68 „	(Frosch todt). Ziemlich viel Saprophyten. Etwa 50 Proc. Milzbrandbac. in Leukocyten.	—	—
34	68 „	(Frosch todt). Etwa 20 Proc. Milzbrandbacillen in Leukocyten.	—	—
30	95 „	(Frosch lebendig). ca. 31 Proc. Bacillen in Leukocyten. Ein grosser Theil der Bacillen färbt sich schlecht. Doch sind ebensoviele der degenerirten frei, wie aufgenommen.	—	27 Std.
33	7 Tagen	(Frosch todt). Etwa 12 Proc. Bacillen in Leukocyten. Zahl der Bacillen bedeutend geringer wie vorher.	Keine Milzbrand-colonien.	25 „
31	9 „	48 Procent der Bacillen in Leukocyten. Zahl der Bacillen sehr gering. Die meisten sehr blass und involvirt und zwar ebensowohl die aufgenommenen wie die freien.	desgl.	stirbt nicht an Milzbrand.

Da ich Anfangs meinte, dass vielleicht auch die geringere Widerstandsfähigkeit der Frösche gegen Ende des Winters die Resultate beeinflusst haben könnte, so habe ich im Mai 1887 noch eine Versuchsreihe mit kräftigen Sommerfröschen angestellt, deren mit den vorigen Versuchen übereinstimmende Resultate in Tabelle III verzeichnet sind.

Versuche mit abgeschwächtem Milzbrand (Mäuse aber nicht Kaninchen tödtend) in der oben angegebenen Weise angestellt, ergaben mikroskopisch im Ganzen denselben Befund wie vorher (siehe Tabelle IV). Mäuse mit dem Impfstück geimpft, starben zwischen 40 und 84 Stunden. Die Versuche wurden nur bis zum 7. Tage fortgesetzt.

Wurden die Frösche im Brütöfen bei constanter Temperatur von

etwa 23° C. gehalten, so war in den ersten Tagen eine starke Wucherung der im Impfstück enthaltenen Bacillen zu constatiren. Nach 22 Stunden waren drei Frösche gestorben, wahrscheinlich in Folge zu hoher Temperatur.

Bei einem derselben konnten einige Milzbrandbacillen in Leber und Herzblut nachgewiesen werden. Im Impfstück fanden sich viele lange Milzbrandfäden, von denen jedoch nur sehr wenige von Leukocyten aufgenommen waren. Bei einem 24 Stunden nach der Impfung untersuchten lebenden Frosche fanden sich 2 Procent der Bacillen in den Leukocyten, etwa 12 Procent der letzteren enthielten Bacillen (vergl. Tabelle V). Die freien Individuen waren vielfach zu sehr langen, durch mehrere Gesichtsfelder gehenden Fäden ausgewachsen. Auch die Leukocyten hatten solche lange Fäden aufgenommen, welche, um in dem kleinen runden Körper der Zelle Platz zu haben, oft in der mannigfachsten Weise winkelig geknickt oder spiralig gewunden waren.

Die Thätigkeit und Fresslust der Leukocyten schien durch die etwas erhöhte Temperatur gesteigert zu sein. Nach 48 Stunden waren schon 27 Procent der Bacillen in Zellen, nach 68 Stunden ca. 50 Procent, wobei noch zu bemerken ist, dass hier die absolute Menge der vorhandenen Bacillen ungeheuer viel grösser war, als in den Versuchen bei niedriger Temperatur.

Nach 95 Stunden waren 31 Procent der Bacillen von Leukocyten aufgenommen. Von dieser Zeit ab war eine deutliche Abnahme der Bacillen zu beobachten. In den nach länger als 95 Stunden untersuchten Fröschen treten immer mehr abgestorbene Individuen auf. Die absolute Zahl der vorhandenen Bacillen ist aber stets noch beträchtlich grösser als in den Versuchen bei niedriger Temperatur zu derselben Zeit, was sich leicht daraus erklärt, dass in letzterem Falle eine anfängliche Vermehrung nicht stattgefunden hatte. Nach 9 Tagen waren die meisten, sowohl frei als in Leukocyten liegenden Bacillen involvirt. Die Zahl der degenerirten freien Bacillen war sicher nicht kleiner, eher grösser als die der aufgenommenen. Die von Leukocyten gefressenen waren stellenweise nur durch gefärbte Querlinien noch zu erkennen.

Saprophyten waren in allen Fällen neben den Milzbrandbacillen in grosser Anzahl aufzufinden. Ein Theil derselben war ebenfalls in Leukocyten enthalten.

Ausser bei dem oben erwähnten Frosch, der nach 23 Stunden starb, fanden sich niemals Milzbrandbacillen in den Organen und im Herzblut der Thiere.

Die Virulenz der Bacillen war bis zum 7. Tage noch vollständig vorhanden; eine vom Impfstück infectirte Maus starb nach 25 Stunden am Milzbrand. Am 9. Tage waren anscheinend die Bacillen abgestorben, da

eine geimpfte Maus nicht mehr an Milzbrand starb und da auch auf den Platten keine Milzbrandcolonieen sich entwickelten.

Auffallend sind die letzterwähnten Versuche dadurch, dass die Milzbrandbacillen zwar anfänglich sich üppig vermehrten, aber schliesslich doch vollständig zu Grunde gingen und zwar rascher wie in den Versuchen bei niederer Temperatur. Es fragt sich nun, ob die nachträgliche Hemmung des Wachstums und das Absterben der Bacillen der Thätigkeit der Leukocyten zuzuschreiben ist. Wir sahen zwar, dass anscheinend die Activität der letzteren durch die geringe Temperatursteigerung etwas erhöht war und dass sie etwas reichlicher als in den Versuchen bei niederer Temperatur Bacillen aufgenommen hatten, aber es war doch immer höchstens die Hälfte der vorhandenen Bacillen, welche in Leukocyten lag. Wenn wir auch von dieser Hälfte annehmen wollten, dass sie durch Eingeschlossensein in die Zellen am Wachstum gehindert wurden, so ist doch nicht einzusehen, warum ebenso der freie Theil das Wachstum so bald einstellte und rasch zu Grunde ging. Dass die freien Bacillen erst in Folge der Präparation frei geworden seien, wie Metschnikoff bei derartigen Befunden anderen Autoren gegenüber wohl einwendet, ist ausgeschlossen. Abgesehen davon, dass die Präparation sehr sorgfältig in der von Metschnikoff angegebenen Weise stattfand, handelte es sich bei den freien Bacillen um sehr grosse Mengen und oft um lange, durch ein ganzes Gesichtsfeld gehende Fäden, deren Aufnahme höchstens von einer grossen Zahl von aneinander gereihten Leukocyten hätte erfolgen können. Ich darf deshalb mit Sicherheit behaupten, dass das schliessliche Zugrundegehen wenigstens eines grossen Theiles der Bacillen nicht ihrer Aufnahme und Verdauung durch Leukocyten zuzuschreiben war.

Mit Fröschen, welche bei einer Temperatur von 25° bis 27° C. gehalten wurden, erzielte ich folgende Resultate (Tabelle VI).

Zwei Frösche wurden nach 23 Stunden todt gefunden und untersucht. Im Impfstück und um dasselbe hatte sehr starkes Wachstum der Bacillen stattgefunden. Die meisten derselben waren frei, nur einige wenige lagen in Leukocyten. Im Herzblut und in den Organen wurden nicht gerade reichliche kurze Milzbrandstäbchen gefunden; auch konnten Saprophyten ebendort in geringer Zahl constatirt werden. Ein 24 Stunden nach der Impfung getödteter Frosch ergab dasselbe Resultat. Vier Frösche, welche zwischen 31 und 41 Stunden nach der Impfung gestorben waren, lieferten ähnliche Befunde. Auch hier konnten in den nicht spärlich vorhandenen Leukocyten nur sehr selten Bacillen aufgefunden werden.

Ob diese Frösche an Milzbrand gestorben waren, ist bei der oft sehr geringen Zahl der im Blut und in den inneren Organen gefundenen

Tabelle VI.

Versuche mit Fröschen und virulenten Milzbrandbacillen bei 25—30° C.

Vers.-Nr.	Zeit der Untersuchung des Impfstücks	Mikroskopischer Befund
81	23 Stunden	} (Frösche todt). Die Bacillen sind zu langen Fäden ausgewachsen. Selten Aufnahme. In Herzblut u. Leber kurze Milzbrandstäbchen.
82	23 ..	
77	24 ..	(Frosch lebendig). Ueppiges Wachstum der Bacillen an der Impfstelle. Wenige Leukocyten. Sehr selten Aufnahme. In Herzblut und Leber ebenfalls Milzbrandbacillen.
79	41 ..	} (Frösche todt) [nicht vor der 31. Stunde]. Bacillen stark gewuchert. Keine Aufnahme durch Leukocyten. Ziemlich viele Bacillen in Herzblut und in der Leber.
80	41 ..	
82	41 ..	} desgl.
83	41 ..	
78	42 ..	(Frosch lebendig). Bacillen stark gewuchert. Leukocyten nicht selten, doch sehr selten Bacillen enthaltend. Milzbrandbacillen im Herzblut.

Bacillen um so schwerer zu entscheiden, als auch nicht geimpfte Frösche bei erhöhter Temperatur ziemlich rasch zu Grunde gehen.

Es kann nach diesen und den folgenden Versuchen mit noch höherer Temperatur die Möglichkeit nicht von der Hand gewiesen werden, dass die bei 30° und darüber gehaltenen Frösche in ihrer Lebensenergie schon so herabgesetzt sind, dass sie kaum mehr als lebenskräftige Thiere zu betrachten sind und dass ihr widerstandsloser Körper in ähnlicher Weise von den Milzbrandbacillen durchwachsen wird, wie ich dieses bei todtten Fröschen, denen ein Stückchen Milzbrandorgan unter die Haut gebracht war, beobachten konnte.

Die Resultate endlich, welche bei Fröschen in einer Temperatur von 29° bis 37° C. erhalten wurden, sind folgende. Trotz aller Cautelen, wie ausgiebige continuirliche Ventilation des Raumes, in welchem die Thiere sich befanden, und reichliche Feuchtigkeit der Luft gelang es nicht, die Thiere länger, wie 14 Stunden am Leben zu erhalten. Die meisten starben nach 5 bis 7 Stunden. Bei allen hatte üppiges Wachstum der Bacillen um das Impfstück stattgefunden. Bei den meisten waren auch im Herzblut Milzbrandbacillen aufzufinden.

Ueberblicken wir die gesammten Resultate dieser Versuche an Fröschen, so zeigt sich zunächst, dass die Angabe von Metschnikoff, dass um die in Organstückchen unter die Froschhaut gebrachten Milzbrandbacillen starke Leukocytenansammlung stattfindet, und dass diese Leukocyten grosse Mengen von Milzbrandbacillen aufnehmen, vollauf bestätigt werden konnte. Ebenso war ein Zugrundegehen der aufgenommenen Bacillen

innerhalb der Leukocyten mit Sicherheit nachzuweisen. Darin aber weichen meine Befunde von denen Metschnikoff's wesentlich ab, dass ich ebenso viele, wenn nicht mehr Bacillen, wie aufgenommen waren, **ausserhalb** der Leukocyten einer vollständigen Degeneration verfallen sah. Weiterhin waren in meinen Versuchen nach 16tägigem Verweilen unter der Froschhaut im Impfstück noch lebensfähige virulente Milzbrandbacillen nachzuweisen. Niemals war eine Abschwächung der noch am Leben gebliebenen Bacillen zu constatiren.

Dass in den bei stark erhöhter Temperatur gehaltenen Fröschen die Milzbrandbacillen lebhaft wuchern und auch in den Körper des Thieres hineinwachsen, dass an der Impfstelle nur eine geringfügige Ansammlung von Leukocyten und sehr selten Aufnahme von Bacillen stattfindet, stimmt mit den in analogen Versuchen von Metschnikoff erhaltenen Befunden überein.

Das für die Beurtheilung der Phagocytentbätigkeit als Schutz Einrichtung des Organismus wichtigste Moment ist offenbar die Thatsache, dass Milzbrandbacillen unter der Froschhaut auch ausserhalb der Phagocyten in grosser Zahl zu Grunde gehen. Es ist einleuchtend, dass durch Feststellung dieses Befundes die Metschnikoff'schen Experimente an Beweiskraft erheblich gelitten haben.

Die Froschversuche bilden ausser den Beobachtungen an Daphnien die Hauptstütze der Metschnikoff'schen Theorie. Die Versuche an Warmblütern, welche von Metschnikoff in viel geringerer Zahl angestellt waren, lassen schon von vornherein mehr Einwände zu und sind keinesfalls so beweisend, wie die Froschversuche. Indessen war es immerhin wichtig zu erfahren, in wie weit auch beim Warmblüter nennenswerthe Mengen von Bacillen ausserhalb der Zellen ihren Untergang fänden.

II. Versuche an Warmblütern.

Zunächst wiederholte ich die Metschnikoff'schen Impfversuche mit virulenten und abgeschwächten Milzbrand am Kaninchenohr.

In der von Metschnikoff angegebenen Weise wurden sterilisirte dünnwandige Glasröhrchen mit einer Aufschwemmung von Milzbrandreincultur oder von milzbrandigem Organ gefüllt, den Thieren unter antiseptischen Cautelen in eine unter der Haut des Ohres angelegte Tasche gebracht und nach Verschluss der Hautwunde dort zerbrochen.

A. Versuche mit abgeschwächtem Milzbrand.

Mit diesem wurden zunächst an vier Thieren Versuche angestellt. Der abgeschwächte Milzbrand entstammte einer Cultur, welche 18 Tage bei

42° bis 43° C. gehalten war. Derselbe tödtete noch Mäuse, aber nicht Kaninchen.

In einem ersten Versuche ergab die Untersuchung des Ohres nach 22 Stunden starke Ansammlung von Leukocyten um das Impfröhrchen. Dieselben hatten in reichlicher Menge meist sehr stark involvirte Bacillen aufgenommen. Auch die freien Bacillen waren meistens stark involvirt. — Bei Untersuchung der zur Impfung verwandten Cultur stellte sich übrigens heraus, dass auch diese sehr reichliche Involutionsformen enthielt. — Nach 47 Stunden war nur noch ein einziger sehr blasser Bacillus in einem Leukocyten liegend aufzufinden. Die Leukocytenansammlung war fast bis zur Eiterbildung gediehen.

Im zweiten und in den folgenden Versuchen experimentirte ich mit ganz frischen von Involutionsformen freien Culturen. Nach 16 Stunden ergab die Untersuchung eine ziemlich bedeutende Leukocytenansammlung, doch war dieselbe nicht so stark, wie im vorigen Versuch. Die Bacillen waren meistens frei, nahmen aber — ein Zeichen der beginnenden Involution — zum grossen Theil die Farbe nicht mehr gut an.

Nach 22 Stunden wurden etwa 50 Procent der Bacillen als in Leukocyten liegend constatirt. Oft waren längere Fäden von mehreren Leukocyten umflossen. Viele der aufgenommenen Bacillen waren sehr stark involvirt. Nach 41½ Stunden war die Zahl der Bacillen geringer geworden; etwa 50 Procent derselben lagen jetzt in Leukocyten. Diese sowohl, wie die freiliegenden boten meist den Anblick ausgeprägter Involutionsformen dar. Nach 64 Stunden fanden sich überhaupt nur noch sehr wenige Bacillen, aber darunter immer noch freie.

Bei den übrigen Versuchen gestalteten sich die Befunde ähnlich. Nach etwa 16 Stunden wurde ein zellreiches Exsudat um das Impfröhrchen gefunden, doch waren in demselben noch die allermeisten Bacillen frei und zum Theil gut erhalten.

Nach 22 Stunden war ein Theil von Leukocyten aufgenommen und dieser sowohl wie der freie Theil bestand fast nur aus Involutionsformen. Von da ab verschwanden die Bacillen allmählich, aber immer liessen sich, solange überhaupt Bacillen aufzufinden waren, auch freie nachweisen.

Einige Versuche, welche mit dem Pasteur'schen ersten Milzbrandvaccin angestellt wurden, ergaben ähnliche Resultate.

Waren die Glasröhrchen mit ganz frischer Bouilloncultur solchen Vaccins gefüllt, so fand sich nach etwa 20 Stunden um dieselben ein seröses Exsudat mit einer mässigen Menge von Leukocyten. Die Bacillen waren fast alle frei und etwa zur Hälfte von normalem Aussehen und Färbungsvermögen. Nach 30 Stunden hatte die Zahl der Leukocyten zugenommen, die der Bacillen hatten sich vermindert. Letztere waren

zwar meist degenerirt, aber höchstens zur Hälfte von Leukocyten aufgenommen. Nach 45 bis 48 Stunden waren zwischen und in den reichlicher gewordenen Leukocyten nur noch ganz spärliche, völlig degenerirte Bacillen nachzuweisen.

Wurde dagegen statt frischer Bouilloncultur eine Aufschwemmung von einer alten Cultur auf schräger Agarfläche zur Füllung der Röhren verwendet, so dass fast nur Sporen und Involutionsformen unter die Haut des Thieres gelangten, so war nach etwa 20 Stunden die Leukocytenansammlung fast bis zur Eiterbildung gediehen. Die Bacillen waren völlig degenerirt. Im Gegensatz zu dem Befund bei Versuchen mit frischer Cultur, in denen um diese Zeit noch die meisten Bacillen frei waren, war hier schon über die Hälfte der stark degenerirten Bacillen von Leukocyten aufgenommen. Nach 30 bis 45 Stunden hatte die Leukocytenansammlung sich noch etwas gesteigert. Innerhalb des Röhrens und nahe um dasselbe hatte sich ein zäher Eiter gebildet, in welchem Milzbrandbacillen nur mit grosser Mühe, theils frei, theils aufgenommen, aber in beiden Fällen stark involvirt, aufgefunden werden konnten. Fremde Mikroorganismen, welche die Eiterung hätten hervorrufen können, wurden in diesen und auch in den folgenden Versuchen vermisst.

B. Versuche mit virulentem Milzbrand.

Zunächst wurde wieder an drei Thieren mit einer alten sporen- und involutionsformenreichen Cultur experimentirt. Der Befund war hier Anfangs ähnlich, wie in den Versuchen mit abgeschwächtem Milzbrand. Das Exsudat war ziemlich reichlich und Leukocyten fast ebenso zahlreich, wie in den vorigen Versuchen. Nach 17 Stunden war etwa der dritte Theil der Bacillen von Leukocyten aufgenommen. Diese sowohl, wie auch die freien waren stark involvirt. Das weitere Schicksal der Sporen und Bacillen an der Impfstelle konnte in diesen Versuchen leider nicht verfolgt werden. Die Thiere starben sämmtlich an Milzbrand.

In zwei anderen Versuchen wurde Aufschwemmung von Milz einer eben an Milzbrand gestorbenen Maus, also sehr lebenskräftiges Material zur Impfung verwandt. 20³/₄ Stunden nach der Impfung fand sich an der Impfstelle ein sehr geringfügiges Exsudat und eine seröse Durchtränkung des umgebenden Gewebes. Im Exsudat waren wenig Leukocyten vorhanden. Keiner der letzteren hatte einen Bacillus aufgenommen. Die Bacillen selbst waren üppig gewuchert und sämmtlich von normalem Aussehen. — Auch späterhin nahm das Exsudat nicht zu. Die Thiere starben nach ca. zwei Tagen an Milzbrand.

In den in der beifolgenden Tabelle (Nr. VII) verzeichneten Versuchen mit virulentem Milzbrand an Kaninchen wurden etwas grössere Mengen Impfmateriale zur Füllung der Röhren verwandt (0.3^{cem} im Durchschnitt). Es zeigte sich dabei, dass die locale Reaction ein wenig bedeutender ausfiel, als in den vorigen Versuchen. Das Gewebe in der Umgebung des Impfröhrens liess in allen Fällen eine starke seröse Durchtränkung (Milzbrandgeschwulst) erkennen. In der nächsten Umgebung des gebrochenen Röhrens fand sich bei Verwendung eines involutionsformenreichen Impfmateriale ein zahlreiches Exsudat, welches später fast eitrig wurde. In demselben scheinen die Bacillen anfangs manchmal gewachsen zu sein, später gingen sie jedoch zu Grunde und zwar der grösste Theil unabhängig von den Zellen. Wenn in letzteren Bacillen gefunden wurden, so waren dieselben immer stark involvirt. Im Serum, welches das Gewebe um das Röhren durchtränkte, wucherten die Bacillen sehr üppig. Leukocyten waren in diesem Serum relativ wenig vorhanden und diese hatten keine Bacillen aufgenommen.

Bei Infection mit frischen, lebenskräftigen Bacillen war die Leukocytenansammlung um das Röhren geringer. Zur Eiterbildung kam es nicht. Es degenerirten zwar auch hier einige Bacillen, doch waren dieselben meist frei. An der Impfstelle fand dann bald eine starke Wucherung der Bacillen statt und von diesen lebenskräftigen Bacillen wurde kaum je einer in Leukocyten gesehen. Es kann hier nicht meine Aufgabe sein, die mannichfaltigen an sich sehr interessanten Verschiedenheiten in der localen Reaction weiter zu verfolgen. Es können nur ganz sorgfältig ausgeführte grosse Versuchsreihen die diesbezüglichen Thatsachen sicher stellen. Ganz so einfach, wie Metschnikoff und Christmas-Dirkinck-Holmfeld annehmen, sind die Beziehungen zwischen virulentem und abgeschwächtem Milzbrand auf der einen, und localer Reaction auf der anderen Seite wohl nicht. Nach meinen Versuchen ist wenigstens die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, dass auch der grössere oder geringere Gehalt der zur Injection verwandten Culturen an Involutionsformen auf die Stärke der localen Reaction von Einfluss ist; vielleicht ist auch die Menge der eingebrachten Bacillen nicht indifferent, — alles Punkte, über die nur nach eingehenden Versuchen zuverlässige Angaben möglich sind.

Was meine Versuche aber deutlich zeigen und worüber sie in erster Linie Aufschluss geben sollten, ist die Thatsache, dass, wenn Bacillen im Exsudat zu Grunde gehen, dies bei dem weitaus grössten Theile ausserhalb der Zellen stattfindet.

Bei Versuchen an immunen Thieren konnte ich, was die Stärke der localen Reaction betrifft, die Resultate von Metschnikoff und Christmas-Dirkinck-Holmfeld bestätigen. Fünf Kaninchen wurden nach

Tabelle VII.

Versuche mit virulenten Milzbrandbacillen am Kaninchen.

Art des zur Impfung verwandt. Materials	Befund nach 20 Stunden	Befund nach 30 Stunden	Befund nach 45 Stunden	Thier gestorben nach:
6 Wochen alte Gelatinecultur, welche in Controlpräparaten fast nur Sporen und Involutionsformen zeigt.	Ziemlich starke Schwellung um das Impfröhrchen. In dessen nächster Umgebung viele Leukocyten. Bacillen sehr reichlich, zum grossen Theile gut gefärbt (gewachsen). Doch auch viele involvirte. Von letzteren ein kleiner Theil in Leukocyten.	Im Röhrchen und in dessen nächster Umgebung Eiterbildung. Im Eiter nicht viele Bacillen. Etwa die Hälfte involvirte. Aufnahme nicht häufig.	Im Eiter mässig viele Bacillen, fast sämmtlich degenerirt, doch meistens frei. In der Umgebung des Röhrchens aus dem Gewebe quellenden Flüssigkeit reichliche normale Bacillen; wenig Leukocyten.	50 Stunden an Milzbrand.
Aufschwemmung von Milz einer an Milzbrand gestorbenen Maus. 9 Stunden nach dem Tode des Thieres. (Viele Bacillen schon degenerirt)	Schwellung um das Impfröhrchen. In Exsudat zieml. viel Leukocyten. Bacillen reichlich. Zum grössten Theil degenerirt. Ein kleiner Theil der letzteren in Leukocyten.	Im zellenreichen Exsudat in der nächsten Umgebung des Röhrchens ziemlich viel Bacillen. Mehr degenerirt wie vorher. Selten Aufnahme durch Leukocyten.	Im Eiter um das Röhrchen wenige ganz degenerirte Bacillen. Dieselben meistens frei. Im Serum viele gut gefärbte Bacillen, wenig Leukocyten. Keine Aufnahme.	52 Stunden an Milzbrand
8 Tage alte Bouilloncultur mit zum grössten Theil normalen Bacillen	Exsudat um das Röhrchen ziemlich reichlich. Ziemlich viele Leukocyten. Bacillen sehr reichlich, fast alle normal. Einige degenerirt frei. Sehr selten Aufnahme.	Keine Eiterbildung. Im übrigen wie vorher.	In der das Gewebe in der Umgebung des Impfröhrchens durchtränkenden Flüssigkeit zieml. reichliche Leukocyten, ungemein viele normale Bacillen. Einige degenerirt frei und in Leukocyten.	ca. 50 Std. an Milzbrand.
desgl. Injection von 0.3 ^{ccm} unter die Haut des Ohres.	Etwas weniger Leukocyten, sonst wie vorher.	Wie oben.	Wie oben.	
6 Wochen alte Gelatinecultur, fast nur Sporen und Involutionsformen enthaltend.	Leukocytenreiches Exsudat. In demselben nur degenerirte Bacillen. Ein Theil derselben ist von Leukocyten aufgenommen.	Im Serum aus dem Gewebe, in der Umgebung des Röhrchens mässig viele, sämmtlich normale Bacillen. Wenig Leukocyten. Keine Aufnahme.		48 Stunden an Milzbrand.

Fortsetzung.

Art des zur Impfung verwandt. Materials	Befund nach 20 Stunden	Befund nach 30 Stunden	Befund nach 45 Stunden	Thier gestorben nach:
Aufschwemmung einer 10 Stunden alten Bouillon-cultur in NaCl-Lösung. Nur normale Bacillen.	Ziemlich starke seröse Durchtränkung des Gewebes um das Impfröhrchen. Im Serum wenig Leukocyten. Bacillen fast alle normal. Einige degenerirte frei. Ein solcher in einem Leukocyten.	Keine Zunahme der Leukocyten. Reichliche Bacillen. Dieselben fast sämmtlich normal; keine Aufnahme.		48 Stunden an Milzbrand

der Methode von Chamberland und Roux durch intravenöse Injection von 50^{ccm} einer Bouilloncultiv von Pasteur'schem Vaccin I gegen Milzbrand immunisirt. Etwa eine Woche nach der Injection wurden vier Thieren unter die Haut des Ohres etwa 0.3^{ccm} einer frischen Bouilloncultiv von virulentem Milzbrand, einem Thiere das gleiche Quantum von Pasteur'schem Vaccin II eingespritzt. Bei sämmtlichen Thieren war nach 24 Stunden ziemlich bedeutende Röthung des Ohres und Schwellung um den Impfstich herum zu bemerken. Bei Einstich in die geschwollene Stelle entleerte sich ein Tropfen dicken Eiters. In demselben waren mikroskopisch reichlich Milzbrandbacillen aufzufinden, theils gut erhalten, theils mehr weniger stark degenerirt. Der weitaus grösste Theil dieser Bacillen lag frei. Die wenigen, welche in den Leukocyten gefunden wurden, zeigten kein normales Aussehen, sondern erwiesen sich als degenerirt, jedoch theilweise nicht in stärkerem Maasse, als ein grosser Theil der freien Bacillen. Nach 48 Stunden waren alle Bacillen sehr stark involvirt. Die Aufnahme durch Leukocyten hatte indessen kaum zugenommen.

Da die Eiterknoten nicht schnell resorbiert wurden, sondern allmählich eine mehr käsige Beschaffenheit annahmen, so konnte ihr Inhalt noch nach längerer Zeit auf das Vorhandensein von Bacillen untersucht werden. — Vermittelst der Gram'schen Methode gelang es noch nach acht Tagen die total degenerirten Bacillen, aber fast sämmtlich frei, nachzuweisen.

III. Mikroskopische Beobachtungen auf geheiztem Objecttisch.

Es ist durch die vorstehend geschilderten Versuche wahrscheinlich gemacht, dass die Vernichtung der Bacterien im lebenden Körper nicht ausschliesslich der Thätigkeit der Leukocyten zufällt, sondern dass sich

auch noch andere Einflüsse am Zustandekommen der Degeneration derselben betheiligen. Am lebenden Thier lassen sich indessen immer nur einzelne Phasen in den gegenseitigen Beziehungen zwischen Bacillen und Leukocyten constatiren. Einen besseren Einblick in manche in Betracht kommende Umstände konnte ich zu gewinnen hoffen, wenn ich in mikroskopischen Präparaten direct das Verhalten der dem Körper entnommenen Leukocyten zu Bacillen längere Zeit hindurch continuirlich zu beobachten versuchte. So war vielleicht in derartigen Versuchen genauer festzustellen, ob die Leukocyten gleich die Bacillen aufnehmen oder erst nach längerer Zeit, und ob virulente und abgeschwächte Bacillen sich etwa in dieser Beziehung verschieden verhalten. Auch versprochen derartige Beobachtungen genaueren Aufschluss darüber zu geben, ob wirklich und in welchem Umfange eine Degeneration der nicht von Leukocyten aufgenommenen Bacillen in thierischen Flüssigkeiten stattfindet.

Eine Anwendung dieser Methode erschien um so mehr angezeigt, als auch Metschnikoff sich derselben bedient hatte. Derselbe fand bei Zusammenbringen von Milzbrandbacillen mit Froschllymphe auf dem heizbaren Objecttische, dass nur die in den Leukocyten liegenden Bacillen Degenerationserscheinungen zeigen, und dass die Leukocyten von für Milzbrand empfänglichen Thieren bei analogen Versuchen in geringerem Maasse die Fähigkeit zeigen, Bacillen aufzunehmen, als die von ganz oder bedingungsweise immunen Thieren.

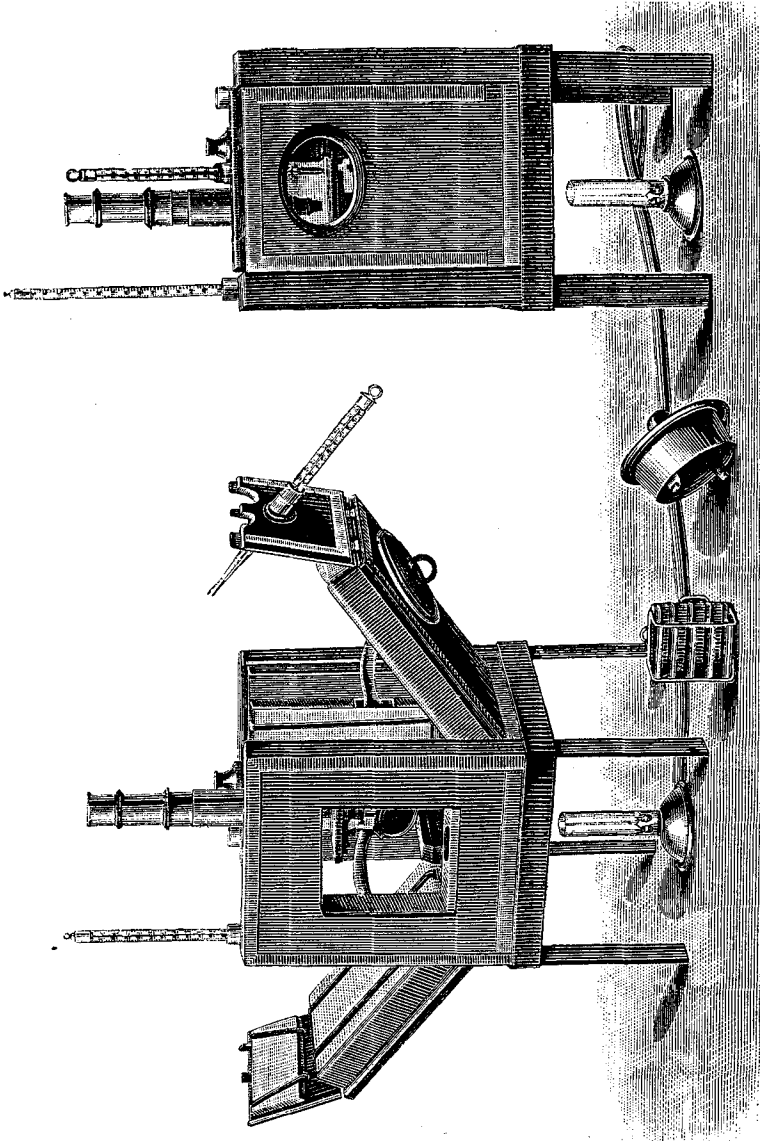
Meine Versuche in dieser Richtung, welche anfangs nur zur Nachprüfung dieser Metschnikoff'schen Behauptungen angestellt waren, ergaben sehr bemerkenswerthe Resultate, so dass eine weitere Ausdehnung derselben wünschenswerth erschien. Ich habe deshalb nach einander das Verhalten der Milzbrandbacillen und später auch noch einiger anderer Bacterien im Blut, in der Lymphe und mehreren anderen Gewebsflüssigkeiten aus verschiedenen Thierspecies eingehend geprüft.

Versuchsordnung.

Zum Zwecke der mikroskopischen Beobachtung wurden Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit auf ein Deckglas gebracht, mit einer kleinen Menge Milzbrandbacillen am Rande geimpft und nun mit Paraffin auf einen hohlgeschliffenen Objectträger aufgekittet. Derartige Präparate lassen sich lange Zeit beobachten und bei Beachtung aller Vorsichtsmaassregeln ist eine Verunreinigung derselben durch Saprophyten für die Zeit der Beobachtung absolut ausgeschlossen.

Zur Impfung der Tropfen wurden stets nur frische, lebenskräftige Bacillen verwendet und zwar entweder eine dünne Aufschwemmung von Milz einer eben an Milzbrand gestorbenen Maus oder ganz frische in sterilisirter Kochsalzlösung vertheilte Milzbrandfäden aus einer ca. 12 Stunden alten Bouillon-cultur.

Die in derartigen jungen Culturen schwimmenden Flocken von dicht verfilzten Milzbrandfäden wurden mit einer gebogenen Platinnadel herausgefischt und in 10 bis 12 ^{cem} Kochsalzlösung übertragen. Die gleichmässige Vertheilung in



Wärmekasten. Links geöffnet, Frontansicht; rechts geschlossen, Seitenansicht. Zwischen beiden Abbildungen auf der Tischfläche der conische Deckel zum Verschluss der seitlichen Oeffnung, sowie ein kleines Gestell, mit Hilfe dessen mehrere Reservepräparate im Kasten untergebracht werden können.

letzterer stiess anfänglich auf einige Schwierigkeiten; doch lässt sich dieselbe in sehr vollkommener Weise erreichen, wenn man in einem starkwandigen Probir-
röhrchen die Flüssigkeit mit etwas sterilisirtem groben Sand oder feinstem Kies

kräftig schüttelt. Es gelingt durch dieses Verfahren eine Zertheilung der Fäden in lauter einzelne Bacillen.

Von dieser dünnen Aufschwemmung wurden die Tropfen am Rande mit einer kleinen Platinöse geimpft, sodass etwa 30 bis 100 Bacillen in einen Tropfen gelangten. Die bei Uebertragung der Flocke in die Salzlösung mithineingebrachte Bouillon war durch die Menge der ersteren so verdünnt, dass bei den minimalen Mengen, welche zur Impfung der Tropfen verwandt wurden, ein etwaiges Mitübertragen von Nährstoffen sicher nicht in Frage kam.

Sollten die Beobachtungen bei Warmblüterttemperatur angestellt werden, so bediente ich mich statt des hierzu bis jetzt gewöhnlich verwendeten heizbaren Objecttisches eines Wärmekastens, welcher das ganze Mikroskop aufnimmt. Derselbe ist nach einer von Sachs angegebenen Idee modificirt; im Ganzen einem von Zeiss in Jena in Handel gebrachten Apparat ähnlich, besitzt derselbe vor diesem doch einige Vorzüge. — Die Seitenwände sind nämlich nicht aus Holz, sondern doppelwandig aus Metall construirt. Der Zwischenraum zwischen den Wandungen ist an den fixen Theilen, Vorder- und Hinterwand und Boden, mit Wasser gefüllt, bei den in Charnieren nach auswärts zu klappenden Seitenwänden mit Asbest. Ausserdem ist der ganze Apparat mit Ausnahme des kupfernen Bodens mit Filz bekleidet. Durch diese Construction ist es möglich, mit Hülfe einer kleinen Gasflamme die Temperatur im Innern äusserst genau constant zu halten. Um nicht bei etwa nothwendigen Verschiebungen des Objectes eine ganze Seitenwand aufklappen zu müssen, wodurch die Temperatur im Innern des Apparates zu sehr herabgesetzt werden würde, ist in der linken Seitenwand in der Höhe des Objecttisches des Mikroskopes eine ovale Oeffnung angebracht, welche eben das Einführen der Finger resp. der Hand und somit ein Verschieben des Objectes ohne erhebliche Aenderung der Temperatur des Innenraumes gestattet. Für gewöhnlich ist diese Oeffnung durch einen konischen Deckel verschlossen. Aus der Abbildung sind die näheren Details in der Construction leicht zu ersehen.

In einem derartigen Wärmekasten hält sich die Temperatur mit Leichtigkeit bis auf Bruchtheile von Graden durch lange Zeit constant und man hat vor den heizbaren Objecttischen bisheriger Construction den grossen Vortheil, dass die Temperatur des Objectes wirklich genau die vom Thermometer angezeigte ist. — Die inneren Flächen der Wandungen werden beim Gebrauch mit mehrfachen Lagen von feuchtem Fliesspapier ausgekleidet.

A. Versuche mit Froschlymphe und Froschblut.

Das für diese Versuche nothwendige leukocytenreiche Plasma wurde in der Weise gewonnen, dass einem Frosch unter aseptischen Cautelen ein Stückchen sterilisirte Watte unter die Haut des Rückens gebracht wurde. Nach 24 Stunden hatte sich um dieses Wattepföpfchen soviel Lymphhe angesammelt, dass man durch Aufsaugen derselben mit einem Capillarrohr mehrere Tropfen derselben bekommen konnte, welche in der obenbeschriebenen Weise mit Milzbrandbacillen geimpft und längere Zeit beobachtet wurden.

An diesen Präparaten war bald nach Beginn der Untersuchung die Aufnahme von Bacillen durch die lebhaft beweglichen Leukocyten zu constatiren. Längere Fäden wurden oft von mehreren Leukocyten geradezu umflossen, so dass rosenkranzartige Gebilde entstanden. Degenerationsvorgänge waren sowohl an den freien, wie an den aufgenommenen Bacillen nach einigen Stunden deutlich zu sehen, indessen ausgesprochen und prompt nur bei Temperaturen zwischen 15° und 18° C.

Zwei freie Bacillen, die bei 15° C. continuirlich beobachtet wurden, zeigten nach vier Stunden deutliche Zeichen des Zerfalles. Bei 18° C. wurde in längeren freien Fäden die Involution einzelner Glieder im Verlaufe weniger Stunden deutlich beobachtet. Ebenso konnte ich in mehreren anderen Fällen bei dieser Temperatur an freien Bacillen innerhalb 3 bis 6 Stunden deutliche Veränderungen wahrnehmen.

Die Veränderungen bestanden hauptsächlich darin, dass das Protoplasma des Bacillus zunächst körnig wurde und der Contour eine mehr unregelmässige Begrenzung annahm. Nach und nach verschwand entweder die körnige Structur wieder, der Contour erschien scharf, der Bacillus selbst aber wurde blasser und entschwand dem Blicke fast vollständig; oder die Körnung des Protoplasmas nahm noch mehr zu und der Bacillus zerfiel in mehrere Stückchen. Auch kolbige und knotige Auftreibung beobachtet man an den absterbenden Bacillen ziemlich oft. Ebenso ist Quellung oft um das Doppelte der normalen Dicke nichts Seltenes. Alle diese Veränderungen lassen sich an freiliegenden Bacillen sehr gut beobachten.

Bei den in Leukocyten liegenden dagegen macht das directe Beobachten der Degenerationserscheinungen sich etwas schwieriger, da der einmal vollständig in das Protoplasma der Zelle aufgenommene Bacillus ohne Zusatz von Reagentien nicht sehr deutlich zu sehen ist. Nur manchmal sieht man im frischen Präparat die Veränderungen auch an aufgenommenen Bacillen sehr klar, wenn diese brückenförmig über einer Vacuole liegen. Nach der Färbung der Präparate treten übrigens auch an den übrigen in Zellen liegenden Bacillen die Zerfallserscheinungen sehr gut hervor.

Zur Färbung wurde ausschliesslich eine dünne alkalische Methylenblaulösung verwandt, welche die Veränderungen der Bacillen von ihren ersten Anfängen bis zur stärksten Ausbildung in ausgezeichnet fein abgestufter Weise zur Anschauung bringt, so wie dieses oben näher beschrieben ist. Vermittelt der von Metschnikoff angegebenen Vesuvinmethode lassen sich feinere Unterschiede in der Degeneration der Bacillen nicht erkennen. Dieselbe zeigt höchstens, ob ein Bacillus noch lebenskräftig, oder ob er ganz abgestorben ist.

Wurden die bei 15° bis 18° gehaltenen Präparate nach etwa 6 Stunden gefärbt, so zeigte sich, dass mindestens 50 Procent der freien Bacillen degenerirt waren, während im Anfange des Versuches in Controlpräparaten nur normale Bacillen gefunden wurden. Die freien degenerirten Bacillen waren in allen Präparaten mindestens ebenso reichlich wie die aufgenommenen.

Bei höheren Temperaturen (23° bis 24° C.) konnte ich nach mehreren Stunden an den freien Bacillen keine Veränderung constatiren. An den aufgenommenen wurden in einem Falle nach 18 Stunden Veränderungen gesehen. Ob dieses Resultat jedoch constant ist, möchte ich auf Grund meiner wenig zahlreichen Versuche nicht entscheiden.

Bei den vielfach angestellten Versuchen zwischen 15° bis 18° C. war niemals Wachstum der Bacillen zu sehen, während sich in einem zur Controle mit Bouillon hergestellten analogen Präparat 3 gleichzeitig continuirlich beobachtete Bacillen um $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{3}$ ihrer ursprünglichen Länge vergrößert hatten, ein Zeichen, dass es nicht die niedere Temperatur der Präparate war, die das Wachstum behinderte.

Mehrfach wurde festgestellt, dass die Leukocyten lange Bacillenfäden aufnehmen und in der mannigfachsten Weise krümmen und knicken können. — In einigen Fällen wurde um die aufgenommenen Bacillen Bildung von Vacuolen gesehen, eine Erscheinung, welche Metschnikoff nach Analogie mit den Amöben als Symptom der intracellulären Verdauung der Bacillen seitens der Leukocyten auffasst. Nach meinen Beobachtungen scheint ihr eine derartige Bedeutung nicht zuzukommen, da ihr Auftreten ein ganz regelloses war. Manchmal fanden sich Vacuolen in Zellen, welche gar keine Bacillen enthielten, dann, — und dies ist nicht so selten — zeigte sich um manche Bacillen sofort nach der Aufnahme Vacuolenbildung, und endlich fehlte diese in den allermeisten bacillenhaltigen Zellen überhaupt.

Es ist mithin aus diesen Versuchen mit Froschllymphe nicht zu entnehmen, dass den Leukocyten an der Vernichtung der Bacillen ein ausschlaggebender Antheil zukommt.

Beobachtungsreihen, welche in analoger Weise an hängenden Tropfen von aus dem Herzen von Fröschen entnommenen Blute angestellt wurden, ergaben fast das nämliche Resultat. Von Anfang an wurden ziemlich viele Bacillen von den Leukocyten aufgenommen, doch blieb stets ein sehr grosser Theil frei. Freie sowohl wie aufgenommene Bacillen erwiesen sich nach 5 bis 6 Stunden in gefärbten Präparaten als vollständig degenerirt. An den freien konnte ich die fortschreitende Degeneration auch im frischen Präparate sehr gut beobachten.

Aehnlich waren die Erscheinungen im Blut einer Kröte, nur dass hier die Degeneration der Bacillen etwas schneller vor sich ging (siehe Tab. IX).

B. Versuche mit Blut von Warmblütern.

Bei den folgenden Versuchen mit Säugethierblut wurde von dem einem kleinen Blutgefässe oder einer kleinen Wunde entquellenden Blut rasch mit einer Platinöse ein Tröpfchen auf ein Deckglas gebracht, in oben beschriebener Weise am Rande mit Milzbrandbacillen geimpft, und dann wurde das Deckglas mit Paraffin auf einen schon vorgewärmten hohlgeschliffenen Objectträger aufgekittet.

Das Präparat wurde dann sofort in den Wärmekasten des Mikroskopes, welcher auf die Bluttemperatur des betreffenden Thieres erwärmt war, eingebracht und dort beobachtet.

Selbstverständlich wurde bei der Entnahme des Blutes aus dem Körper und beim Uebertragen desselben auf die Deckgläser die strengste Asepsis beobachtet. Die Deckgläser, auf welche die Tropfen gebracht wurden, waren durch Erhitzen in der Flamme eines Gasbrenners sterilisirt. Verunreinigung des Blutes durch fremde Mikroorganismen habe ich deshalb nur sehr selten beobachtet.

Da die Blutstropfen auf dem Deckglase nach kurzer Zeit gerannen, und die um das Coagulum übrigbleibende und von diesem ausgepresste blutig seröse Flüssigkeit sich vorwiegend am Rande des Tropfens ansammelte, so wurden die Milzbrandbacillen stets am äussersten Rande des Tropfens eingebracht, damit sie auch während der ganzen Dauer der Beobachtung von Flüssigkeit umgeben waren und nicht etwa mit in das Coagulum eingeschlossen wurden. Auch erleichterte natürlich die grössere Durchsichtigkeit der dünnen Randschicht die Beobachtungen wesentlich. Das Gerinnen des Blutes hebt, wie hier schon bemerkt werden möge, die bacterienfeindlichen Eigenschaften desselben nicht auf; vielmehr lehrten uns später besondere Versuche, dass auch defibrinirtes Blut dieselben in hohem Maasse besitzt.

Ein oder zwei der jeweilig angefertigten Präparate wurden nun unter dem Mikroskop continuirlich beobachtet. Zuerst wurde das ganze Präparat durchmustert, um zu sehen, ob schon Bacillen von Leukocyten aufgenommen seien, dann wurden einige freie Fäden eingestellt und die an diesen auftretenden Veränderungen constatirt. Die nicht continuirlich beobachteten Präparate wurden ebenfalls im Wärmekasten des Mikroskops aufbewahrt und nach verschiedenen langen Zeiträumen auf die an den Bacillen eingetretenen Veränderungen erst im frischen und dann im gefärbten Zustande durchmustert.

Tabelle VIII.

Versuche mit Blut verschiedener Thierarten und Milzbrandbacillen im hängenden Tropfen.

Vers.-Nr.	Temperatur d. Tropf. Grad C.	Thier-species	Zahl der Versuche	Zeit der maximalen Degeneration nach:	Von Leukocyten aufgenommen	Bemerkungen
1	37.5	Mensch	4	1 Stunde	Viele Bacillen	31 Bacillen aufgenommen. 36 Bacillen degenerirt und frei.
2	37.5	"	4	$\frac{3}{4}$ "	"	In nach $1\frac{3}{4}$ Stunden gefärbten Präparaten nur noch wenige normale Bacillen.
3	37.5	"	3	1 "	"	In gefärbten Präparaten nur noch sehr wenige normale Bacillen, viele degenerirte freie.
4	37.5	"	1	$1\frac{1}{4}$ "	"	In nach zwei Stunden gefärbten Präparat nur involvirte Bacillen, frei und aufgenommen.
5	37.5	"	2	1 "	"	Im gefärbten Präparat fand sich nur noch ein normaler Bacillus.
6	37.5	"	1	$1\frac{1}{2}$ "	"	Sehr viele freie Bacillen stark degenerirt.
7	37	Hund	6	$2\frac{1}{2}$ "	Mässig viele Bacillen	(Thier zu Tode chloroformirt). Wenig degenerirte Bacillen, davon 50 Procent frei. Meistens nach kurzer Zeit Wachstum.
8	37	"	6	1 "	"	Nach 4 Stunden noch Degenerationsformen. Nach 24 Stunden starkes Wachstum.
9	37	"	4	$1\frac{1}{2}$ "	"	
10	40—41	Huhn	6	$2\frac{1}{2}$ "	Viele Bacillen	Nur in der Mitte des Tropfens Degeneration.
11	40—41	"	8	$1\frac{1}{2}$ "	"	Nach 24 Std. starkes Wachstum.
12	40—41	Taube	8	$1\frac{1}{2}$ "	"	Wenig Degenerationsformen. Nach $2\frac{1}{2}$ Stunden Wachstum.
13	37.5	Immuner Hammel	6	1 "	Ziendl. viele Bacillen	Nach 24 Stunden noch kein Wachstum.
14	37.5	Hammel	6	$1\frac{1}{2}$ "	"	Nach 24 Std. üppiges Wachstum.

Im Ganzen ergaben diese Versuche, dass zwar ein Theil der Bacillen von den Leukocyten aufgenommen wurde, dass aber der grössere Theil derselben frei blieb und dennoch mehr weniger stark degenerirte. Betreffs der Aufnahme der Bacillen durch Leukocyten und der Schnelligkeit und Ausgiebigkeit der Degeneration der freien Individuen zeigten die Blutarten der verschiedenen Thierspecies ziemlich bedeutende Differenzen.

Tabelle IX.

Versuche mit Blut verschiedener Thierarten und Milzbrandbacillen im hängenden Tropfen

Vers.-Nr.	Temperatur d. Tropf. Grad C.	Thier-species	Zahl der Versuche	Zeit der maximalen Degeneration nach	Von Leukocyten aufgenommen	Bemerkungen
15	37	Kaninchen	2	2¼ Stund.	Mässig viele Bacillen	
16	37	„	1	6 „	„	Die ersten Bacillen degenerirten nach ¾ Stunden. Degenerirte Bacillen meist frei. Nach 24 St. kein Wachsth., nur Degenerationsform.
17	37	„	6	5¼ „	„	Alle Bacillen degenerirt, meist frei. Nach 23 Std. Wachstum.
18	37	„	2	ca. 5 „	„	Anfang der Degeneration nach 45 Minuten.
19	37	„	4	—		In zwei nach 28 Stunden untersuchten Präparaten Beginn des Wachstums neben Degenerationsformen. In zwei Präparaten nur Degenerationsformen.
20	37	„	1	—		Im nach 23 Std. untersuchten Präparate fast nur Degenerationsform. Nach 47 Std. üppiges Wachstum.
21	37	Maus	2	Keine Degeneration	Wenige Bacillen	Nach 1½ Std. hat schon Wachstum stattgefunden; nach 3 Std. ist dasselbe sehr deutlich.
23	37	„	4	„	„	} desgl.
24	37	„	4	„	„	
25	17—19	Frosch	4	5 Stund	Viele Bacillen	Gleichmässige Degeneration der freien u. aufgenommenen Bacillen.
26	16—17	„	5	5 „	„	
27	15—17	„	8	ca. 6 „	„	
28	16—17	Kröte	5	2¾ „	„	

In den beifolgenden Tabellen (VIII und IX) ist das Verhalten der Milzbrandbacillen im Blut verschiedener Thiere übersichtlich zusammengestellt.

Als Zeit der maximalen Degeneration ist darin der Zeitpunkt bezeichnet, wo am frischen Präparat eine Zunahme der Veränderungen an den Bacillen nicht mehr constatirt werden konnte. Indem ich aus einer grösseren Anzahl von Einzelbeobachtungen das Mittel nahm, gelang es, diesen Zeitpunkt wenigstens annähernd zu fixiren. Nach Eintritt der

maximalen Degeneration blieb der Zustand der Bacillen in den weiter auf der betreffenden Temperatur gehaltenen Präparaten eine Zeit lang stationär, dann trat in den Tropfen, welchen grössere Mengen von Bacillen zugefügt und in welchen noch entwicklungsfähige Reste waren, allmählich Wachstum ein, so dass nach einiger Zeit der ganze Tropfen sich von einem dichten Filz von Milzbrandfäden durchwachsen zeigte. In anderen Präparaten (z. B. Vers. 16) kam es zu einer vollständigen Degeneration aller Bacillen, und dann blieb natürlich auch in späterer Periode das Wachstum aus.

Von den maximal degenerirten Präparaten wurde stets eine Anzahl mit Methylenblau gefärbt, und die so gewonnenen Bilder bestätigten und erweiterten das am ungefärbten Object erhaltene Resultat.

Zur Controle gleichzeitig bei derselben Temperatur in einem Tropfen Kochsalzlösung oder Bouillon gehaltene Bacillen derselben Provenienz zeigten, wenn im Blutpräparat schon die maximale Degeneration eingetreten war, im ersten Fall nur normale Bacillen im zweiten starkes Wachstum.

In den Tabellen sind die an den einzelnen Thierspecies erhaltenen Resultate ungefähr in der Reihenfolge des Eintrittes der maximalen Degeneration der freien Bacillen zusammengestellt. — Wir sehen, dass diese Degeneration am schnellsten im Menschenblut eintritt, wo sie in einem Falle schon nach $\frac{3}{4}$ Stunden, im Durchschnitt nach $1\frac{3}{4}$ Stunden beobachtet wurde. Doch möchte ich aus meinen wenigen Versuchen nicht auf eine Constanz dieser Unterschiede in den Blutarten schliessen. — In einem Falle traten schon nach $2\frac{1}{2}$ Stunden in continuirlich beobachteten Präparaten wieder normale Bacillen auf und nach 4 Stunden war deutliches Wachstum zu constatiren. Es waren sehr zahlreiche Bacillen in den Tropfen gebracht worden, und wahrscheinlich war nur ein kleiner Bruchtheil derselben geschädigt.

Von Leukocyten aufgenommen waren viele Bacillen, doch lagen immer noch die meisten frei. Wie sich der Umfang der Degeneration der freien Bacillen zu demjenigen der in die Leukocyten aufgenommenen verhält, zeigt Fig. 9 auf Tafel IV. Es geht aus derselben hervor, wie sehr die degenerirten freien Fäden die eingeschlossenen überwiegen.

Fast ebenso schnell wie im Menschenblut trat die Degeneration im Blute von einem immunisirten Hammel ein, wo dieselbe nach einer Stunde maximal war. Nach 24 Stunden waren immer noch Degenerationsformen vorhanden, während nach 26 Stunden Wachstum constatirt werden konnte. Die Abbildung Fig. 8 zeigt, dass die Degeneration nicht so stark war, wie im Menschenblut; es ist indessen möglich, dass nach einer Stunde noch nicht das Maximum der Degeneration erreicht war, wofür auch das späte Eintreten des Wachstums in diesen Präparaten spricht. Die Zahl

der Beobachtungen war leider zu gering, als dass ich auf die zeitliche Differenz Gewicht legen könnte. Bei einem nicht immunen Hammel wurde die maximale Degeneration erst nach $1\frac{1}{2}$ Stunden beobachtet und es trat in diesen Präparaten früher Wachsthum auf.

Beim Experimentiren mit Hundeblood wurde zunächst eine Probe mit dem Blute eines zu Tode chloroformirten Thieres gemacht. Die Degeneration in diesem Blute war eine geringfügige, in den meisten Präparaten fehlte sie sogar fast ganz und es trat statt ihrer nach kurzer Zeit Wachsthum ein. Das mangelhafte Vorgehen der Degeneration muss vielleicht der Todesart des Thieres und der relativ späten Blutentnahme zur Last gelegt werden, da das Blut der Hunde, wie aus den beiden anderen in der Tabelle verzeichneten Versuchen hervorgeht und auch durch spätere Versuche bestätigt wurde, sonst eine ziemlich energische bacterienvernichtende Kraft besitzt, welche der des menschlichen Blutes nahezu stehen scheint. Die Hundeleukocyten sah ich nicht, wie Metschnikoff, verfallen, sondern sogar ziemlich viele Bacillen aufnehmen.

Das Vogelblood schien nur eine geringe bacterientödtende Kraft zu besitzen. Die Degeneration war namentlich geringfügig, was die Menge der degenerirten Bacillen anlangt; dagegen traten die Degenerationserscheinungen sehr rasch ein. Auch konnte ich schnelle Aufnahme durch Leukocyten beobachten. Aus der Abbildung Fig. 7 ist indess ersichtlich, dass die absolute Menge der degenerirten freien Bacillen immerhin noch recht bedeutend war.

Der geringe quantitative Effect schien hauptsächlich dadurch bedingt zu sein, dass der Blutstropfen, sowie er auf's Deckglas gebracht war gerann, und ausser einem festen Coagulum nur ganz wenig blutig gefärbte Flüssigkeit zurückliess. Spätere Versuche, in denen das rasche Coaguliren durch vorgängiges Defibriniren vermieden und eine grössere Menge Blut verwandt wurde, lassen keinen Zweifel an der energischen bacterienvernichtenden Kraft des Vogelbloodes aufkommen.

Langsamer, als in den bisherigen Beobachtungen, aber dafür sehr vollständig, vollzog sich die Zerstörung der Bacillen im Blute von Kaninchen. Hier war im Durchschnitt nach etwa fünf Stunden das Maximum erreicht und zeigten sich dann fast alle Bacillen involvirt. Nach der 28. Stunde trat auch hier gewöhnlich Wachsthum ein.

Leukocyten sah ich kurz (30') nach dem Zusammenbringen des Blutes mit den Bacillen letztere aufnehmen, und auch bei späterer Durchmusterung der Präparate zeigte sich, dass ein ziemlicher Theil der Bacillen in Zellen lag, wenn derselbe auch nicht so bedeutend ausfiel, wie beim Blut anderer Thiere. Ich kann demnach die Behauptung von Metschnikoff, dass Kaninchenleukocyten auf dem heizbaren Objecttisch ebensowenig be-

fähigt seien, virulente Milzbrandbacillen aufzunehmen, wie im lebenden Thier, nicht bestätigen.

Fast gar keine Degeneration, sondern unverzögertes Wachstum trat ausnahmslos im Mäuseblut auf. Die Aufnahme durch Leukocyten war hier eine sehr geringfügige.

Es wurden nun ausser Blut noch einige andere Gewebsflüssigkeiten in den Bereich der Untersuchung gezogen, wobei ich besonders mein Augenmerk auf solche richtete, welche möglichst wenig zellige Elemente enthalten, um dem Einwande zu begegnen, als ob die Leukocyten dennoch auf irgend eine Weise an der Degeneration der Bacillen schuld seien.

In dieser Beziehung ist offenbar Humor aqueus sehr geeignet; derselbe enthält, wie auch Metschnikoff zugiebt, sehr wenige Leukocyten. Etwas mehr Leukocyten als Humor aqueus, aber auch immer noch sehr wenige, zeigte Liquor pericardii.

Tabelle X.

Versuche mit Milzbrandbacillen und einigen thierischen Flüssigkeiten im hängenden Tropfen.

Vers.-Nr.	Temperatur d. Tropf. Grad C.	Thier-species	Art der Flüssigkeit	Zahl der Versuche	Zeit der maximalen Degeneration nach	Bemerkungen
29	38	Kaninchen	Humor aqueus	2	1 Stunde	Im gefärbten Präparat sind nur noch hochgradigste Degenerationsformen zu finden.
30	38	4	1 ..	Nach 1 Std. sind im ungefärbten Präparat die Bacillen nicht mehr wahrzunehmen.
31	38	..	Liquor pericardi.	2	1 ..	desgl.

Versuche mit nachträglicher Impfung der Blutproben.

Vers.-Nr.	Temperatur Grad C.	Thier-species	Art der Flüssigkeit	Zahl der Versuche	Impfung der Proben nach	Bemerkungen
33	37	Kaninchen	Blut	4	3½ Std.	Wenige Bacillen degenerirt. Nach kurzer Zeit Wachstum.
34	37	5	16 ..	Keine Degeneration. Nach kurzer Zeit üppiges Wachstum.
35	37	5	22 ..	Rasches Wachstum. Keine Degeneration
36	37	5	28 ..	desgl.

Trotzdem erwiesen sich in genau wie vorher angelegten Versuchen diese drei Flüssigkeiten von erheblicher bacterienschädigender Wirkung (s. Tabelle X). Figg. 10 und 11 zeigen die ausserordentlich starke Degeneration der Bacillen im Humor aqueus eines Kaninchens nach ca. 2 Stunden. In Fig. 10 sind neben den degenerirten einige, die gleiche Zeit unter denselben Bedingungen in einem Tropfen NaCl-Lösung gehaltene Bacillen gezeichnet, um den starken Unterschied augenfällig zu machen.

Es wurde weiterhin noch versucht, wie lange ungefähr ausserhalb des Körpers das Blut seine bacterienfeindlichen Eigenschaften bewahrt. Zu diesem Zwecke bereitete ich einige Blutproben (Kaninchenblut) in gewöhnlicher Weise vor, nur liess ich die Tropfen vor der Impfung erst verschieden lange Zeit bei der Körpertemperatur des Thieres stehen. Es zeigte sich (s. Tabelle X), dass in nach 4—16 Stunden geimpften Tropfen keine Degeneration, sondern gleich Wachsthum eintrat.

Ohne vorläufig auf einen Erklärungsversuch der bacterienschädlichen Eigenschaften thierischer Flüssigkeiten einzugehen, können wir als sicheres Resultat unserer Versuche wohl hinstellen, dass in denselben die Zerstörung der Bacterien nicht durch die active Thätigkeit der Leukocyten bedingt ist. Die erwähnten Versuchsergebnisse und ein Blick auf die Abbildungen lassen dies klar erkennen.

Ich habe zwar bestätigen können, dass ein Theil der Bacillen von den weissen Blutzellen aufgenommen wird und in denselben degenerirt, aber ich konnte auch beobachten, dass sich dieselben Zerfallsprocesse, und zwar in viel grösserem Umfange, an den reichlich vorhandenen freien Bacillen in genau derselben Weise einstellten. Noch unwahrscheinlicher wird der Einfluss der Leukocyten, wenn wir in Betracht ziehen, dass in sehr leukocytenarmen Flüssigkeiten (Liqu. pericardii und Humor aqueus) ebenfalls in kurzer Zeit eine vollständige Degeneration der Bacillen eintrat. Wir werden vielmehr durch alle diese Beobachtungen zu der Vermuthung gedrängt, dass auch die von den Leukocyten aufgenommenen Bacillen schon nicht mehr vollständig normal waren, und dass das eigentliche bacterienfeindliche Moment in der die Zellen umgebenden Flüssigkeit zu suchen ist. Der Parallelismus, welcher in den meisten Versuchen zwischen der Schnelligkeit des Eintrittes der Bacterienvernichtung und der Aufnahme durch Leukocyten besteht, spricht entschieden für eine solche Annahme. Je rascher die Degeneration der freien Bacillen erfolgt, um so mehr finden wir in Leukocyten. Tritt nur langsame Degeneration ein, so erlahmt und erlischt inzwischen die Lebensenergie der Leukocyten, und es ist dann nur noch geringfügige Aufnahme in die Zellen möglich.

Wir sehen beim Menschen und beim Kaninchen, wo Unterschiede in der Aufnahme am deutlichsten hervortreten, die Leukocyten nicht länger

als $2\frac{1}{2}$ Stunde lebendig bleiben, dagegen erreicht die Degeneration der Bacillen beim Kaninchen erst nach ca. 3 Stunden den Höhepunkt, während sie beim Menschen schon nach einer Stunde vollendet ist. Dementsprechend ist die Aufnahme durch Leukocyten beim Menschenblut weit reichlicher, als beim Kaninchenblut. Im Mäuseblut wurden entsprechend der sehr geringen Wirkung desselben auf freie Bacillen, auch nur eine kleine Anzahl Bacillen in den Leukocyten gefunden.

Dass beim Frosch trotz langsamer Degeneration doch reichliche Aufnahme stattfand, erklärt sich ungezwungen daraus, dass Kaltblüterleukocyten ausserhalb des Körpers bei weitem länger lebensfähig sind, als solche von Warmblütern. Nach 5—6 Stunden sah ich Froschleukocyten noch ziemlich ausgiebige Bewegungen ausführen.

IV. Culturversuche.

Aus den Versuchen mit hängenden Tropfen ist nicht mit voller Sicherheit zu ersehen, ob das Blut die Bacillen nur verändert, oder ob die als degenerirt bezeichneten Bacillen, wenigstens zum Theil, auch wirklich abgestorben, d. h. in gutem Nährsubstrat nicht mehr entwicklungsfähig sind. Diese Frage zu beantworten war um so wünschenswerther, als Fodor¹, auf Grund einiger Versuche — die allerdings mit so erheblichen Fehlerquellen behaftet waren, dass sie als beweisend nicht angesehen werden können — behauptet hatte, das Blut sei unmittelbar nach der Entnahme aus dem Körper im Stande, Milzbrandbacillen zu zerstören. Auf Grund dieser Versuche hatte Fodor angenommen, dass das rasche Verschwinden von in die Gefässe injicirten Mikroorganismen dadurch bedingt werde, dass dieselben im Blute in kurzer Zeit getödtet und vernichtet werden.

Herr Prof. Flügge forderte mich daher auf, durch Culturversuche wo möglich quantitativ festzustellen, ob und in welchem Umfange Milzbrandbacillen im frischen, dem lebenden Thier entnommenen Blute entwicklungsunfähig werden.

Das einzuschlagende Verfahren bestand im Wesentlichen darin, dass eine geringe, durch das Plattenverfahren gezählte Menge Bacillen dem Blute zugefügt und nach längerer Berührung mit demselben wiederum gezählt wurde. Durch Variiren der Zeiträume, während welcher man das Blut und die Bacterien in Berührung liess, bez. nach welchem man die Bacterien zusetzte, musste es dann leicht sein, festzustellen, wie rasch das Blut die Bacterien tödtet und wie lange es seine bacterienfeindlichen Eigenschaften bewahrt.

¹ *Deutsche medicinische Wochenschrift*. 1887. Nr. 34.

Ich habe nun in diesem Sinne eine grosse Zahl von Versuchen angestellt mit dem Resultate, dass wirklich ganz bedeutende Mengen von Bacillen durch das Blut entwicklungsunfähig gemacht werden.

Die Versuchsanordnung war folgende:

Das einer Arterie oder Vene ent quellende Blut wurde in einer sterilisirten etwa 50 ^{cm} fassenden Glasstopfenflasche, in welcher sich etwas sterilisirter feinsten Kies befand, aufgefangen.

Die Flasche hatte bis zum Augenblick des Einlaufenlassens des Blutes im Thermostaten bei 38° gestanden, so dass eine Abkühlung des Blutes nicht stattfand. Nachdem die nöthige Menge Blut (etwa 25 bis 30 ^{cm}) eingeflossen war, wurde der Glasstöpsel aufgesetzt und das Glas einige Male kräftig geschüttelt, wobei dann durch die feinen Steinchen ein sehr vollständiges Defibriniren des Blutes bewirkt wurde.

Das Defibriniren war aus zwei Gründen nicht zu umgehen. Erstens konnte nur so die Gesamtmenge der Blutprobe auf die eingebrachten Bacterien einwirken. Das Blut der untersuchten Thiere bildet so rasch nach der Entnahme ein Coagulum, dass man ohne vorgängige Defibrinirung höchstens mit dem ausgepressten Serum die Bacillen mischen kann, gar nicht zu reden von der Schwierigkeit, derartig rasch gerinnendes Blut in mehrere Gefässe gleichmässig zu vertheilen. Wenn es aber auch gelingt, das nicht defibrinirte Blut in kleinen Portionen zunächst gleichmässig mit den Bacillen zu mischen, so ist doch später eine genaue Ermittlung der Zahl der noch in ihm enthaltenen Bacillen deshalb nicht möglich, weil das sich nach kurzer Zeit bildende Coagulum, welches einen durchaus uncontrolirbaren Theil der Bacillen einschliesst, unmöglich bei Anlegung von Plattenculturen in der verflüssigten Gelatine auch nur annähernd gleichmässig vertheilt werden kann.

Es zeigte sich indess bei meinen Versuchen, dass bei raschem Defibriniren des Blutes mit Kies die bacterienfeindlichen Eigenschaften desselben sich noch in sehr erheblichen Grade bemerklich machen.

Von dem defibrinirten Blute wurden sogleich (das Defibriniren dauert nur wenige Secunden) Proben von etwa 0.5 bis 1 ^{cm} mittelst einer sterilisirten Pipette in kleine schon vorgewärmte Reagensgläser gebracht, welche mit Wattepfropfen verschlossen und zum Schutze gegen Verdunstung später noch mit Gummikappen überzogen wurden.

Bei Benutzung von Mauseblut wurden immer mehrere Thiere durch Schlag auf den Kopf getödtet, der Thorax aseptisch eröffnet, das Blut mit einer feinen Pipette aus dem geöffneten Herzohr entnommen, in Reagensgläser gebracht und hier rasch durch Schlagen und Rühren mit einer Platinöse defibrinirt. Diese Art der Blutgewinnung sowie das unvollkommene Defibriniren mit der Platinöse bedingen häufige Misserfolge und lassen die bei Mäusen erhaltenen Resultate als nicht hinreichend beweisend erscheinen.

Die Blutproben in den Reagensgläsern wurden unmittelbar nach der Einföllung geimpft und dann rasch in einen auf der Körpertemperatur des betreffenden Thieres gehaltenen Thermostaten gesetzt. Alle diese Manipulationen geschahen so rasch, dass eine wesentliche Abkühlung des Blutes nicht wohl stattfinden konnte.

Zur Impfung des Blutes benutzte ich eine gleichmässig dünne Aufschwemmung von Milz einer eben an Milzbrand gestorbenen Maus in sterilisirter NaCl-Lösung. Von dieser Aufschwemmung wurde jedesmal dieselbe kleine Platinöse gefüllt und dem Blute zugefügt. Aus den Tabellen ist zu ersehen, dass gewöhnlich in einem Versuche fast die gleiche oder doch eine hinreichend genau übereinstimmende Menge von Bacillen dem Blute beigemischt wurde (siehe die Zahlen der bei den Controlplatten gewachsenen Colonieen). Einer exacteren Abmessung der bacillenhaltigen Flüssigkeit, etwa mit einem calibrirten Capillarrohr, stand das Bedenken entgegen, dass dabei zuviel Kochsalzlösung in das Blut gebracht werden konnte. Uebrigens sind bei den Controlplatten Differenzen von 50 bis 100 Procent immer noch irrelevant gegenüber den enormen und völlig beweisenden Ausschlägen der Versuche.

Nach der Impfung der Blutproben wurde zunächst die Zahl der eingebrachten Bacillen bestimmt. Es geschah das in der Weise, dass dieselbe Platinöse-aufschwemmung, welche dem Blute zugefügt war, mit 8 bis 10 ^{ccm} verflüssigter Nährgelatine gemischt und zu einer Platte ausgegossen wurde, wobei darauf geachtet wurde, dass alle im Gläschen enthaltene Gelatine — bis auf die unvermeidlich an den Wänden zurückbleibenden aber bei einiger Aufmerksamkeit in allen Fällen gleichen Reste — auf die Platte kam.

Die so hergestellten Controlplatten wurden dann in einer Temperatur von 22° C. gehalten, und nach ca. 24 Stunden wurde durch Zählung der Colonieen die Menge der in das Blut eingebrachten Bacillen ermittelt.

Von den in den Thermostaten gestellten Blutproben wurden von Zeit zu Zeit einige herausgenommen und nach Zufügung von 8 ^{ccm} verflüssigter Nährgelatine und ausgiebiger Mischung die noch in ihnen enthaltenen lebensfähigen Bacillen in ganz gleicher Weise durch Plattencultur gezählt. Die Platten (z. Th. in Petri'schen Schalen) wurden 3 bis 4 Tage in Thermostaten gehalten.

Aus diesen in verschiedenen Zwischenräumen vorgenommenen Zählungen ist nun ohne weiteres zu ersehen, dass das Blut die Fähigkeit besitzt, eine ziemlich bedeutende Anzahl von Bacterien zu vernichten. Ferner geht daraus hervor, dass die verschiedenen Blutarten in verschiedenem Maasse diese Fähigkeit besitzen (siehe Tabellen XI bis XIV).

Die letztbetonten Unterschiede treten jedoch nicht immer deutlich hervor, weil die Versuche quantitativ zu verschieden waren, sowohl bezüglich der Blutmenge, wie der Bacterieneinsaat, und deshalb nicht ohne Weiteres miteinander verglichen werden können. Einigermassen vergleichbar sind die an immunen und nicht immunen Hammeln gewonnenen Resultate.

Beim immunen Hammel sank in einem Falle in 3½ Stunden die Zahl der Milzbrandbacillen von 4578 bez. 4872 auf 185 bez. 283, im anderen Falle von 11,046 bez. 9245 auf 427 bez. 665, während bei einem nicht immunen Hammel die Zahl in 3 Stunden nur von 7938 bez. 8330 auf 6664 bez. 4782 gefallen war. Auch in dem zweiten Falle war die Abnahme relativ viel weniger bedeutend als beim immunen Hammel.

Tabelle XI.
Versuche mit Milzbrandbacillen und Kaninchenblut.

Vers.-Nr.	Temperatur, bei welcher die Proben nach der Impfung standen	Zeitdauer zwischen Impfung und Anfertigung der Platten	Zahl der gewachsenen Colonieen
1	37—38° C.	3 Contr. sofort	94068—90000—27000
"	"	2 nach 1 Std.	33070—70
"	"	1 „ 4 „	0
"	"	1 „ 5 „	0
2	"	4 Contr. sofort	15015—18707—16095—13113
"	"	2 nach 1 Std.	0—5
"	"	2 „ 2 „	2—3
3	"	2 Contr.	7000—6930
"	"	2 nach 3 Std.	45—153
"	"	1 „ 4 „	977
"	"	1 „ 5 „	461
"	"	1 „ 23 „	1668
4	"	2 Contr.	23—9
"	"	2 nach 2 Std.	0—0
5	"	2 Contr.	9—11
"	"	2 nach 2½ Std.	0—0
6	"	2 Contr.	952—2000
"	"	2 nach 2 Std.	25—1
7	19—21°	2 Contr.	7000—6930
"	"	1 nach 4 Std.	9
"	"	1 „ 6 „	23
"	"	1 „ 23 „	0

Tabelle XII.
Versuche mit Milzbrandbacillen und Blut von Mäusen.

8	38° C.	2 Contr. sofort	Unzählig
"		2 nach 2 Std.	"
"		1 „ 3 „	"
"		2 „ 3½ „	"
9	38—39° C.	2 Contr. sofort	882—588
"		1 nach 1 Std.	665
"		1 „ 2 „	329
"		1 „ 3 „	798
"		1 „ 4 „	2499
"		1 „ 5 „	728
Versuch mit Milzbrandbacillen und Taubenblut.			
12	41° C.	2 Contr. sofort	25—40
		2 nach 2½ St.	0—0

Tabelle XIII.

Versuche mit Milzbrandbacillen und Blut eines nicht immunen Hammels.

Vers.-Nr.	Temperatur, bei welcher die Proben nach der Impfung standen	Zeitdauer zwischen Impfung und Anfertigung der Platten	Zahl der gewachsenen Colonien
10	37.5° C.	2 Contr. sofort	7938—8330
		2 nach 1 Std.	4263—4312
		2 „ 2 „	2499—7321
		2 „ 3 „	6664—4782
		2 „ 4 „	11025—3136
		2 „ 5 „	Unzählbar
		2 „ 6 „	„
		2 „ 21 „	„

Versuche mit Blut eines Hammels, der 48 Stunden nach Impfung mit Pasteur'schem Milzbrandvaccin I getödtet war.

14	39—40° C.	2 Contr. sofort	406—343
		2 nach 1 Std.	72—49
		2 „ 2 „	93—60
		2 „ 3 „	90—88
		2 „ 4 „	65—108
		2 „ 5 „	35—13

Tabelle XIV.

Versuche mit Milzbrandbacillen und Blut von immunen Hammeln.

11	37—38° C.	2 Contr. sofort	4578—4872
		2 nach 1 Std.	1400—1050
		2 „ 3 ¹ / ₂ „	185—283
		2 „ 6 „	3360—9555
		1 „ 8 „	Unzählbar
		1 „ 20 „	„
13	39° C.	2 Contr. sofort	11466—9245
		2 nach 1 ¹ / ₂ Std.	2660—5194
		2 „ 1 „	1813—2009
		1 „ 2 „	1764
		2 „ 3 ¹ / ₂ „	427—665
		1 „ 6 „	3451

Ob dieser Unterschied zwischen immunen und nicht immunen Hammeln in Betreff der Wirksamkeit des Blutes constant ist, müssen weitere Versuche lehren; die von mir erhaltenen Resultate könnten immerhin von Zufälligkeiten bedingt sein, da in den übrigen Versuchen die Zahl der vom gleichen Blut jeweils vernichteten Bacillen so ausserordentlich stark variirt.

Kaninchenblut konnte in einem Versuch (siehe Tabelle XI) bis

90,000 Bacterien vernichten, während in einem anderen Versuch von 7000 eingebrachten Bacillen (siehe Tabelle XI) immer noch ca. 45 bis 153 lebensfähig blieben. Auch das Blut des nicht immunen Hammels (siehe Tabelle XIII) zerstörte im ersten Falle immerhin einige Tausend Bacillen, während im zweiten Falle nicht einmal 400 vernichtet werden konnten. Worauf diese Differenzen zurückzuführen sind, das ist ohne weitere specielle Versuchsreihen nicht zu entscheiden.

In den Fällen, in welchen nicht alle Bacillen abstarben, trat nach einiger Zeit im Blute Vermehrung der noch vorhandenen Bacillen ein. Im Mauseblut wuchsen die Bacillen schon bald nach dem Einbringen. Man sieht in den Tabellen deutlich, wie nach dem Erreichen einer bestimmten Minimalzahl, wieder ein allmähliches Ansteigen der Bacillenmenge stattfindet. Die Zeit, nach welcher das Maximum der Degeneration bei den verschiedenen Blutarten erreicht wurde, lässt sich nicht ganz genau fixiren; es sind auch dazu entschieden grössere Versuchsreihen nöthig. Bei Kaninchenblut waren einmal schon nach 1 Stunde (Tabelle XI, Vers. 2) alle eingebrachten 15,000 Bacillen todt, während in den anderen Versuchen das Maximum zwischen der 2. und 3. Stunde zu liegen scheint. Beim immunen Hammel scheint nach $3\frac{1}{2}$ Stunden ein weiteres Degeneriren von Bacillen nicht mehr stattzufinden.

Von Bedeutung ist der Nachweis, dass die bacterienvernichtende Kraft des Blutes überhaupt nach einiger Zeit nachlässt, und dass das Blut dann einen guten Nährboden für die Bacillen darstellt.

Es beweist das, dass die bacterienfeindliche Eigenschaft nicht etwa einem fixen desinficirenden Stoffe im gewöhnlichen Sinne zuzuschreiben ist, man müsste denn annehmen, dass dieser Stoff bei der Zerstörung der Bacterien selbst unwirksam werde. Auch diese Annahme ist aber nicht berechtigt, wie die Versuche zeigen, in welchen ich das Blut eine bestimmte Zeit stehen liess und erst dann die Bacillen hineinbrachte. Es zeigte sich (siehe Tabelle XV), dass nach 8 Stunden langem Stehen die bacterienvernichtende Kraft von Kaninchenblut nur noch eine sehr geringe und also auch ohne Einbringung von Bacillen erloschen war. Es kann daher das bacterienfeindliche Agens entweder nur ein sehr flüchtiger oder ein äusserst labiler, leicht durch andere Bestandtheile des Blutes zersetzlicher Stoff sein, oder aber es muss sich, was von vornherein wahrscheinlicher ist, um eine Fermentwirkung handeln.

Dafür spricht z. B. eine fernere Versuchsreihe, in welcher ich Temperaturen von 50 bis 55° auf das Blut einwirken liess, ehe ich die Bacterien zufügte. Es zeigte sich, dass Hundeblut, das 10 und 30 Minuten auf 52° erwärmt war, seine bacterientödtenden Eigenschaften verloren hatte; ebenso hatte Kaninchenblut nach 45 Minuten langem Erhitzen auf

Tabelle XV.

Versuche mit Blut von Kaninchen und Milzbrandbacillen.
(Die Proben werden erst nach längerem Stehen geimpft).

Vers.-Nr.	Temp., bei welcher die Proben vor und nach der Impfung standen	Die Proben werden geimpft nach:	Platten werden angefertigt nach der Impfung:	Zahl der gewachsenen Colonieen
15	38° C.	2 Std.	2 Contr. sofort	952—2000
		4 „	2 nach 2 Std.	6—15
		6 „	2 „ 2 „	1—45
		8 „	2 „ 2 „	672—134
		8 „	2 „ 2 „	588—833
16	19—21° C.	1 „	2 Contr. sofort	7000—6930
		3 „	1 nach 6 Std.	2
		4 „	1 „ 4 „	4
		1 „	1 „ 3 ¹ / ₂ „	46
		3 „	1 „ 22 „	97
		4 „	1 „ 20 „	175
17	Vor der Impfung bei 19—21° C., nach der Impfung bei 37.5° C.	3 „	1 „ 20 „	246
		4 „	1 „ 20 „	246
		3 „	2 Contr. sofort	7000—6930
		4 „	1 nach 4 Std.	108
		3 „	1 „ 3 ¹ / ₂ „	62
		4 „	1 „ 20 „	Unzählbar

55° dieselben völlig eingebüsst (siehe Tabelle XVI). Zehn Minuten langes Erwärmen auf 48 bis 50° hob dagegen die desinficirende Kraft des Blutes noch nicht ganz auf.

Die Temperatur, bei welcher die Blutproben nach der Impfung gehalten werden, scheint, bei Kaninchenblut wenigstens, in den Grenzen zwischen 19° und 38° ohne wesentlichen Einfluss auf die bacterienvernichtende Thätigkeit des Blutes zu sein, wie aus Tabelle XV zu ersehen.

Es kam mir ferner noch darauf an durch einige vorläufige orientirende Versuche zu erfahren, in welcher Weise andere thierische Flüssigkeiten sich den Milzbrandbacillen gegenüber verhalten. Wir sahen schon oben, dass Humor aqueus und Liquor pericardii auf dem erwärmten Objecttisch ähnliche Eigenschaften zeigen, wie das Blut.

Aus Tabelle XVII ist nun ersichtlich, dass für Liquor pericardii und Humor aqueus auch durch die Culturversuche bacterienfeindliche Eigenschaften constatirt wurden. Ebenso zeigte ein sehr zellarmes pleuritisches Exsudat vom Menschen energische bacterienvernichtende Eigenschaften. — In einigen anderen Versuchen mit Humor aqueus erhielt ich übrigens

Tabelle XVI.

Versuche mit erhitztem Blut.

Vers.-Nr.	Thierspecies	Temperatur, auf welche das Blut erwärmt wurde.	Temperatur, bei welcher die Proben nach der Impfung standen	Platten werden angefertigt nach:	Zahl der gewachsenen Colonieen
18	Hund	nicht erhitzt	37.5°	2 Contr.	825—637
	"	"	"	2 nach 1 Std.	113—343
	"	10 Minuten auf 52° C.	"	2 „ 1 „	931—1666
	"	30 Minuten auf 52° C.	"	2 „ 1 „	1372—1470
30	Kaninchen	nicht erhitzt	"	2 Contr.	29—44
	"	"	"	2 nach 1 Std.	0—0
	"	"	"	2 „ 2 „	0—0
	"	"	"	2 „ 3 „	0—0
	"	"	"	2 „ 4 „	0—0
	"	"	"	2 „ 17 „	0—0
	"	45 Minuten auf 45° C.	"	2 Contr.	29—44
	"	"	"	2 nach 1 Std.	33—60
	"	"	"	„ 2 „	17
	"	"	"	„ 3 „	99
	"	"	"	„ 4 „	171
	"	"	"	„ 16 „	unzählig

Tabelle XVII.

Versuche mit einigen thierischen Flüssigkeiten.

Vers.-Nr.	Thierspecies	Art der Flüssigkeit	Temperatur, bei welcher die Proben nach der Impfung standen	Platten werden angefertigt nach:	Zahl der gewachsenen Colonieen
23	Mensch	Pleuritisches Exsudat	37.5° C.	2 Contr.	233—180
	"	"	"	2 nach 1 Std.	0—0
	"	"	"	3 „ 2 „	0—0—0
20	Hund	Humor aqueus	"	2 Contr.	825—637
	"	"	"	2 nach 1 Std.	294—168
19	"	Liquor pericard.	"	2 „ 1½ „	28—84
21	Kaninchen	Humor aqueus	"	2 Contr.	1029—1174
	"	"	"	2 nach 2 Std.	1—0
24	"	Liquor pericard.	"	1 „ 2 „	2
	"	Humor aqueus	"	2 Contr.	23—9
	"	"	"	2 nach 2 Std.	0—0

Tabelle XVIII.

Versuche mit Blut von Kaninchen und *A. Bacillus subtilis*.

Vers.-Nr.	Temperatur, bei welcher die Proben standen	Platten werden angefertigt nach:	Zahl der gewachsenen Colonieen
25	—	2 Contr. sofort	13230—2246
	38° C.	2 nach 2 Std.	0—0
28	—	2 Contr. sofort	268—208
	37·5° C.	2 nach 2½ St.	0—0

B. *Bacillus Megaterium*.

26	—	2 Contr. sofort	1160—1200
	38° C.	2 nach 2 Std.	31—154
29	—	2 Contr. sofort	1029—637
	37·5° C.	2 nach 2½ St.	134—0

C. *Staphylococcus pyogenes aureus*.

27	—	2 Contr. sofort	6576—6480
	37·5° C.	2 nach 2½ St.	10416—7680

erheblich geringere Anschläge, ohne dass ich vorläufig bestimmen könnte, worauf diese Schwankungen beruhen.

Ferner war in den bisherigen Versuchen immer nur mit Milzbrandbacillen experimentirt; es schien mir aber wünschenswerth, auch einige andere Bacterien und namentlich Saprophyten in den Kreis der Betrachtung zu ziehen, um zu sehen, ob auch sie der bacterienvernichtenden Kraft des Blutes zum Opfer fallen.

Ich wählte zu diesen Versuchen *Bacillus megaterium* (de Bary) und *B. subtilis*. Zur Impfung des Blutes wurden etwa 12 Stunden alte, sporenfreie Bouillonculturen verwandt.

Bacillus subtilis wurde stets nach 2 Stunden völlig vernichtet (siehe Tabelle XVIII). *Bacillus megaterium* zeigte zwar eine bedeutende Abnahme, war aber nur in einem Falle gänzlich verschwunden.

Auf *Staphylococcus pyogenes aureus* war das Blut ohne jede Wirkung.

Alle diese Versuche sowohl mit anderen thierischen Flüssigkeiten wie mit anderen Bacterien sind indess zu wenig zahlreich, als dass ich daraus allgemeine Ergebnisse ableiten möchte.

Uebereinstimmend mit den bei den directen mikroskopischen Beobachtungen erhaltenen Resultaten konnte jedenfalls auch in den sämtlichen Culturversuchen constatirt werden, dass thierische Flüssigkeiten

auf Milzbrandbacillen und andere Mikroorganismen nachtheilig einwirken. Vermochte ich in den erstgenannten Versuchen nur festzustellen, dass die Bacillen unter dem Einflusse von Blut und anderen Gewebsflüssigkeiten unabhängig von den Leukocyten eine morphologische Degeneration erleiden, so ist es in diesen letzten Versuchen gelungen, den exacten Beweis zu erbringen, dass ein sehr grosser Theil der mit diesen Flüssigkeiten in Berührung gebrachten Bacillen vollständig abgetödtet wird, und zwar in relativ kurzer Zeit.

Vielleicht ergibt sich bei einer verbesserten Methodik eine noch vollkommener Tödtung der Bacterien; ich halte es wenigstens für möglich, dass die auffälligen kleinen Reste von entwicklungsfähigen Bacterien, welche in manchen Versuchen auftreten, auf gewissen nicht leicht vermeidlichen Versuchsfehlern beruhen. — Zuweilen macht die schnelle Zunahme der Zahl von entwicklungsfähigen Bacillen in den mehr als 6 Stunden gestandenen Proben den Eindruck, als ob bei einem Theil der Bacillen keine völlige Tödtung vorliege, sondern nur eine Art Schwächung, von der sie sich allmählich erholen. Einstweilen sind wir aber jedenfalls gewöhnt und berechtigt, die einem Desinficiens ausgesetzten Bacterien als „todt“ zu bezeichnen, wenn sie nach starker Verdünnung mit gutem Nährsubstrat sich unfähig zeigen zur Vermehrung und Colonieenbildung. Eine Aufklärung sowohl über die eigenthümlichen kleinen Reste entwicklungsfähiger Exemplare, wie über die Umstände, unter welchen hin und wieder die letzterwähnte rasche Zunahme der Bacillenzahl erfolgt, kann erst durch weitere Versuchsreihen gegeben werden.

Bei der in den Culturversuchen beobachteten Tödtung der Bacterien ist eine Aufnahme derselben durch Leukocyten als Ursache ihres Untergangs mit Sicherheit auszuschliessen. Die Behauptung von Metschnikoff, dass die Vernichtung der Bacillen im lebenden Körper ausschliesslich durch Phagocynthätigkeit zu Stande kommt, muss daher auf Grund der Resultate meiner sämtlichen Versuche als nicht erwiesen bezeichnet werden.

Welche Bedeutung für den Organismus die hier zum ersten Male näher studirte bacterienvernichtende Eigenschaft seiner Säfte hat, und worauf dieselbe zurückzuführen ist, darüber möchte ich vorläufig keinerlei Hypothesen aufstellen. Erst wenn eine grössere Zahl weiterer Versuche vorliegt, wird es möglich sein, sich einigermaassen begründete Vorstellungen über die Qualität und über die quantitativen Schwankungen dieses eigenthümlichen bacterienschädigenden Mechanismus zu machen.

Erklärung der Abbildungen.

(Taf. IV.)

Fig. 1 bis 5, nach Präparaten von unter die Haut von Fröschen gebrachten Milzbrandorganstücken gezeichnet, zeigen die fortschreitende Degeneration der freien und der von Leukocyten aufgenommenen Bacillen, welche sich in Formveränderungen und Verlust des normalen Färbungsvermögens kundgiebt.

Fig. 1. (Frosch Nr. 21) nach 22 Stunden. Bei *a* und *b* Vacuolenbildung um die aufgenommenen Bacillen.

Fig. 2. (Frosch Nr. 13) nach 100 Stunden. Leukocyt mit sehr vielen Bacillen; mässig starke Degeneration der freien Bacillen.

Fig. 3. (Frosch Nr. 14) nach 7 Tagen. Sehr starke Degeneration der freien Bacillen.

Fig. 4. (Frosch Nr. 31) nach 9 Tagen. Sehr stark degenerirte freie und aufgenommene Bacillen; doch auch noch einige von normalem oder fast normalem Färbungsvermögen.

Fig. 5. (Frosch Nr. 15) nach 10 Tagen. Degeneration der freien und aufgenommenen Bacillen.

Fig. 6 bis 11. Versuche im hängenden Tropfen auf erwärmtem Objecttisch.

Fig. 6. Starke Degeneration eines freien Milzbrandbacillenfadens nach $6\frac{1}{2}$ stündigem Aufenthalt in einem Tropfen Froschblut.

Fig. 7. Milzbrandbacillenfäden nach $1\frac{1}{2}$ stündigem Verweilen in Hühnerblut. (Starke Degeneration.)

Fig. 8. Milzbrandbacillen nach $1\frac{1}{2}$ stündigem Aufenthalt im Blute eines immunen Hammels. Mässige Degeneration.

Fig. 9. Milzbrandfäden in einem Tropfen Menschenblut nach 4 Stunden. Theilweise Aufnahme der Fäden durch Leukocyten; starke Degeneration der freien Fäden.

Fig. 10 und 11. Milzbrandbacillen nach 2 stündigem Aufenthalt in Humor aqueus vom Kaninchen. Sehr starke Degeneration. Bei *A'* und *B'* zum Vergleich normal gefärbte Bacillen aus derselben Cultur aufschwemmung nach 2 stündigem Aufenthalt in NaCl-Lösung.

