

# Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infectionskrankheiten durch dieselben.

Von

Rudolf Emmerich und Oscar Löw.

---

In den letzten 15 Jahren haben sich viele der hervorragendsten Bakteriologen mit der Erforschung der Ursachen der erworbenen oder künstlichen Immunität, sowie des Heilungsvorganges bei Infectionskrankheiten beschäftigt.

Aber auch heute noch sind die Ansichten über das Wesen dieser Vorgänge, deren Erkenntniss grosse Fortschritte der Therapie und Prophylaxe veranlassen wird, sehr verschieden. Beweise für die Richtigkeit irgend einer Ansicht wurden bis jetzt nicht erbracht. Man kann höchstens von Theorieen reden, welche zur Erklärung dieser bisher noch so dunkeln Naturvorgänge aufgestellt wurden. Unsere Abhandlung würde einen für diese Zeitschrift zu grossen Umfang erreichen, wollten wir diese Theorieen in ihrer Gesammtheit erörtern und kritisch beurtheilen.

Wir beschränken uns deshalb darauf, nur diejenigen Hypothesen hier kurz aufzuführen, welche der Wahrheit am nächsten kommen, oder dieselbe sogar bei der einen oder der anderen Infectionskrankheit im Allgemeinen speculativ erschlossen haben, ohne dass bis jetzt experimentelle Belege für diese bis heute nur hypothetischen Aufstellungen und Vermuthungen erbracht wurden.

Schon vor mehr als 10 Jahren hat der Eine von uns (Emmerich) die Ansicht aufgestellt und vertreten, dass die künstliche Immunität durch im Blute und in den Gewebsflüssigkeiten gelöste, chemische Stoffe bedingt sei, eine Ansicht, welche heute fast allgemein anerkannt ist.

Nencki<sup>1</sup> war der Erste, welcher behauptete, dass diese chemischen Körper enzymartiger Natur seien. In neuerer Zeit hat auch R. Pfeiffer<sup>2</sup> diese Substanzen als Enzyme ganz besonderer Art erklärt, „da sie nur in absolut spezifischer Weise auf ein einziges Bakterienprotoplasma abgestimmt sind, indem sie im Thierkörper die organisirte Bakteriensubstanz zur Quellung und Lösung bringen.“

Wir werden im Folgenden zum ersten Mal Beweise für die Ansicht erbringen, dass die immunisirenden Stoffe enzym- oder fermentartiger Natur sind und dass Nencki und R. Pfeiffer in dieser Beziehung ganz im Rechte sind.<sup>3</sup> Dagegen trifft die Ansicht, nach welcher das Enzym des Immunserums nicht von den Bakterien, sondern vom Thierkörper stamme, nicht zu (hierüber siehe unten bei VI). Weiterhin giebt es Enzyme, welche nicht ausschliesslich auf ein Bakterienprotoplasma abgestimmt sind, sondern auch solche, welche verschiedene Arten von Bakterien aufzulösen vermögen, wie z. B. das Enzym des *Bacillus pyocyaneus*, für welches wir den diesbezüglichen Beweis durch die folgenden experimentellen Untersuchungen erbringen werden.

Diese Untersuchungen wurden veranlasst durch eine sehr einfache Beobachtung, die gewiss schon viele Bakteriologen gemacht, aber nicht weiter beachtet, oder nicht richtig gedeutet haben.

Der Eine von uns (O. Löw) beobachtete zuerst, dass Bakterien-Mischculturen, welche (nach dem Resultat von Gelatineplattenculturen) den *Bacillus pyocyaneus* in vorherrschender Zahl enthielten, dicke Bakterienhäute an der Oberfläche und ein reichliches Bakteriensediment bildeten, die aber beide bei längerem Stehen fast vollständig aufgelöst wurden. Lässt man eine Cultur des *Bacillus pyocyaneus* in künstlicher Nährlösung bei 37° C. stehen, so hat sich nach 3 Tagen eine dicke Oberflächenhaut (aus Bacillen bestehend) gebildet. Beim Schütteln zerreisst dieselbe und die einzelnen Stücke fallen zu Boden. Nach 3 Tagen hat sich aber wieder eine neue Bakterienhaut an der Oberfläche gebildet. Dieser Vorgang wiederholt sich bei in Intervallen von einigen Tagen ausgeführtem Schütteln in geeigneter Nährlösung 6 bis 8 Mal oder noch öfter. Schliesslich aber ist ein ganz geringer Bodensatz vorhanden, welcher dem Gewichte nach einen sehr kleinen Bruchtheil des Gewichtes der wiederholt gebildeten

<sup>1</sup> *Schweizer Wochenschrift für Pharmacie*. 1891. Nr. 29.

<sup>2</sup> *Deutsche med. Wochenschrift*. 1896. Nr. 7 u. 8.

<sup>3</sup> Dr. Schweinitz hat für Hog-Cholera dargethan, dass das heilende Princip ein Enzym ist, was uns allerdings erst nach Vollendung unserer Arbeit bekannt geworden ist. Dieses Enzym hat sich jedoch als sehr giftig erwiesen, wenn eine gewisse Menge bei subcutaner Injection überschritten wurde. *The Medical News*. October 1892.

Bakterienoberflächenhäute, ausmacht. Untersucht man den Bodensatz der einige Wochen alten Cultur mikroskopisch, so findet man, ausser sehr vereinzelt Stäbchen ähnlichen Gebilden, nur feinkörnige, mit Fuchsinlösung sich färbende Massen, welche wohl als Zerfallsproducte der Bacillen aufzufassen sind, sowie runde, sich nicht färbende, wahrscheinlich aus Fett bestehende Tröpfchen und ausserdem noch verschiedenartige Krystalle. Somit lässt sich auch mikroskopisch nachweisen, dass die gesammte üppige Bakterienvegetation aufgelöst wurde. Wenn man die Cultur 8 Tage früher untersucht, so kann man noch zahlreiche, mit Fuchsin sich sehr schwach färbende Stäbchen neben vereinzelt gutgefärbten sehen, wie dies aus Fig. 2 der in dieser Zeitschrift zu veröffentlichenden Abhandlung von Dr. Saida, „Ueber die Veränderung der Bakterienzellen durch bakteriolytische Enzyme“, ersichtlich ist. Das Protoplasma der ersteren ist offenbar aufgelöst. Der in einer 6 Wochen alten Cultur verbleibende geringe Bodensatz löst sich zum grössten Theil in verdünnten Mineralsäuren.

Weiterhin fand R. Emmerich, dass in Bouillonreinculturen von Schweinerothlaufbacillen nach kurzer Zeit wirkliche Agglutination im Reagensglase eintritt, insofern die Anfangs gleichmässig in der Bouillon vertheilten Bacillen sich zu schleimigen Massen am Boden des Reagensglases zusammenballen. Während die Bouillon Anfangs wie durch feinste Krystalle gleichmässig getrübt ist, klärt sie sich nach 2 bis 3 Tagen und am Grunde des Reagensglases sitzt ein kaum linsengrosses Häufchen von Bacillen, welches beim Schütteln wie ein Convolut in einander verschlungener und verklebter feinsten Fasern in der Flüssigkeit flotirt, wobei die schleimige Fasermasse noch am Boden festhaftet. Giesst man die überstehende Bouillon theilweise von dem, im wahren Sinne des Wortes „agglutimirten“ Bodensatz ab und überträgt man etwa einen Cubikcentimeter der Bouillon, in welcher Theile des agglutimirten Bodensatzes schwimmen, in eine neue Bouillonprobe, so ist in dieser schon nach viel kürzerer Zeit bei 25° C. abermals ein agglutimirter Bodensatz gebildet, der aber der Menge nach viel geringer ist, als der erste; und wenn man nun noch ein oder zwei Mal in gleicher Weise die Uebertragung vornimmt, so ist schliesslich eine Trübung und ein Bodensatz überhaupt nicht mehr wahrnehmbar, die Bacillenmasse wurde nahezu vollständig bis auf mikroskopisch kaum mehr wahrzunehmende Quantitäten gelöst.

Unter Umständen, d. h. nach häufiger Uebertragung grösserer Mengen von abgelaufenen Bouillonculturen, werden in Folge der hierdurch bedingten Anhäufung von bakteriolytischem Enzym die Rothlaufbacillen schliesslich sogar vollständig gelöst und die Uebertragung der Cultur gelingt nun nicht mehr.

Diese und andere Beobachtungen zeigen, dass auch in Flüssigkeitsculturen Agglutination und, wie wir noch ziffermässig zeigen werden, **vollständige** Lösung der Bakterien beobachtet werden kann, ferner, dass die Agglutination von Bakterien nicht etwa nur eine Eigenschaft der Immunsera ist. Diese Erscheinungen der Agglutination und Lösung der Bakterien werden, wie wir weiterhin zeigen werden, durch **Enzyme** verursacht, welche schon in den Culturen nicht etwa erst in dem durch die pathogenen Bakterien „umgestimmten“ thierischen oder menschlichen Organismus gebildet werden.

Wenn dies richtig ist — und aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass es sich so verhält —, dann lassen sich die Erscheinungen der Agglutination, die künstliche Immunität, das Verhalten von Immunserum und specifischen Bakterien in vitro, sowie der Heilungsvorgang bei verschiedenen bakteriellen Infectiouskrankheiten leicht erklären.

Man kann bei Flüssigkeitsculturen einer grossen Zahl von Bakterienarten (*Bacillus pyocyaneus*, *Schweinerothlaufbacillus* u. s. w.) beobachten, dass der totalen Auflösung ein „Schleimigwerden“ der am Boden der Gefässe sitzenden Bakterienmassen vorhergeht. Dieses Schleimigwerden ist dieselbe Erscheinung, welche neuerdings als „Agglutininirung“ beschrieben wurde.

Die agglutinirende Wirkung der Immunsera ist also keineswegs eine aparte, nur dem Blute oder Serum eigenthümliche Erscheinung.

Dass die Agglutininirung beim Zusatz von Immunserum zur Bakterienkultur nach sehr kurzer Zeit eintritt, während der Beginn derselben in Culturen erst nach einem oder mehreren Tagen beobachtet wird, ist darin begründet, dass mit dem Immunserum grössere Mengen fertigen Enzyms den Culturen zugesetzt werden, während in frischen Bouillonculturen das Enzym erst allmählich neu gebildet wird.

Wenn die Membran der Bakterien aufgelöst wird, bildet das „Schleimigwerden“ oder „Agglutiniren“ ein intermediäres Stadium; es ist die beginnende Verquellung der Membranen.<sup>1</sup> Dass nun ein Bakterienmembranen lösendes Enzym wohl Bakterien schaden kann, für das Thier aber unschädlich ist, begreift sich leicht, denn im thierischen Organismus kommen jedenfalls keine Membranen vor, welche chemisch identisch mit denen der Bakterien sind.

Ebenso hat es nichts Befremdendes, dass Organismen Enzyme bilden können, welche den ersteren selbst wieder schädlich sind; man braucht

<sup>1</sup> Die hypothetische Annahme specieller Agglutinine ist überflüssig.

nur zu bedenken, dass Eiweiss lösende Enzyme von dem selbst aus Eiweissstoffen bestehenden Protoplasma (bezw. Kern) hoher, wie niederer Organismen producirt werden. Die uns gut bekannten Enzyme greifen allerdings lebendes Protoplasma nicht, sondern nur todtcs an, wie z. B. die postmortale Pepsinwirkung auf die Magenwand zeigt. Dass aber manche Enzyme in gewisser Concentration auch lebendes Protoplasma lösen können, kann nicht abgesprochen werden und manche Beobachtungen sprechen sehr zu Gunsten einer solchen Auffassung. Dass weiterhin Pilze Cellulose lösende Enzyme ausscheiden können, welche die Cellulose des Pilzes selbst wieder lösen, lehren uns interessante Beobachtungen R. Hartig's. Manche parasitäre Pilze dringen im Holze lebender Bäume dadurch rasch vorwärts, dass die Spitzen der Mycelfäden ein Cellulose lösendes Enzym ausscheiden, dasselbe Enzym löst nun nach einiger Zeit die älteren Partien des Pilzmycels selbst so radical auf, dass man von den Pilzfäden selbst nichts mehr entdecken kann; nur die vorwärts dringenden Partien bleiben eine Zeit lang von der lösenden Wirkung des eigenen Enzyms verschont.

Ganz ähnlich verhalten sich die Bakterien, insofern in Flüssigkeitsculturen die älteren vegetativen Formen gelöst werden, während die jungen Zellen sich eine Zeit lang weiter vermehren. Man findet daher in älteren Flüssigkeitsculturen Bakterienzellen in den verschiedensten Stadien der Auflösung. Jedem Bakteriologen sind diese „Degenerationsformen“ der Bakterien in alten Culturen wohl bekannt. Man hatte aber bisher nicht erkannt, dass die Entstehung derselben auf die Wirkung eines bakteriolytischen Enzyms in den Culturen zurückzuführen ist. Derartige, durch das Pyocyaneus-Enzym veränderte Bakterienzellen, deren Protoplasma ganz gelöst ist, zeigt die Fig. 2 in der Abhandlung von Dr. Saida.

Wenn die Fäulniss einer 5- bis 10procentigen Eiweisslösung bei Luftabschluss eine Zeit lang im Gange war, kommt sie bekanntlich zum Stillstand, was man der den Bakterien schädlichen Wirkung des entstandenen  $H_2S$  und Indol zuschreibt.

Der Eine von uns (Löw) hat sich indessen überzeugt, dass nach dem Aufhören der Fäulniss ein Eiweisskörper in Lösung ist, welcher nach dem Fällen mit Alkohol, in schwachem Alkali gelöst, baktericide, bezw. bakteriolytische Wirkungen besass. Bei sehr vielen Bakterienulturen scheint der Stillstand der Entwicklung einzutreten, wenn so viel bakteriolytisches Enzym gebildet ist, dass die erreichte Concentration ausreicht, die jeweils neugebildeten Bakterien zu lösen. Dass ein von einer bestimmten Bakterienart secernirtcs Enzym nicht auf die Membranen sämtlicher Bakterienarten lösend wirken kann, ist wohl begreiflich; denn es sind für Membransubstanzen eine grosse Anzahl von Isomeren möglich, welche mit

unseren gewöhnlichen chemischen Mitteln nicht zu unterscheiden sind, andererseits differiren die Membranen substantiell sehr erheblich bei Pilzen und kommen ausser Cellulose (z. B. bei der Essigmutter) auch Chitin und chitinähnliche Substanzen (wenigstens bei höheren Pilzen) und wahrscheinlich auch proteinartige Stoffe in Betracht. Bei vielen Bakterienarten, besonders pathogenen, dürfte das Letztere der Fall sein und damit würde in Uebereinstimmung sein, dass von ein und demselben Enzym Membran wie Protoplasma gelöst werden kann.<sup>1</sup>

Die von verschiedenen Bakterienarten secernirten Enzyme sind sicherlich öfters verschieden, vielleicht isomer, und daraus wäre dann zu erklären, dass man manchmal mit den sogenannten „Stoffwechselproducten“ nur einer einzigen Art die Infection durch dieselbe Art heilen kann, während in anderen Fällen eine bestimmte Infectionskrankheit durch die „Stoffwechselproducte“ verschiedener Bakterienarten heilbar ist. Es ist aber drittens auch möglich, verschiedene Infectionskrankheiten durch die sogenannten „Stoffwechselproducte“ einer einzigen Bakterienart in Heilung überzuführen.

Freilich das, was man früher als „Stoffwechselproducte“ der Bakterien bezeichnete und die Heilung bedingen sollte, sind keineswegs solche, sondern unsere Enzyme.

Wenn z. B. abgetödtete Culturen des Erysipelcoccus Milzbrand heilen können (Emmerich) oder Gonorrhoe (Schmidt), so lässt sich das nach unserer Ansicht dahin erklären, dass Erysipelkokken ein Enzym produciren, das nicht nur die Membranen der Erysipelkokken, sondern auch die der Milzbrandbacillen und der Gonokokken lösen kann. Dasselbe gilt von der Anwendung abgetödteter Pyocyaneusculturen bei Typhus (Rumpf) oder Milzbrand (Bouchard, Charrin, Woodhead, Wood, Hüppe).

Wahrscheinlich werden die Enzyme in den Bakterien als Zymogene producirt und die Enzymnatur erst ausserhalb entwickelt, in gewissen Fällen vielleicht erst unter Luftinfluss. Der Umstand, dass auch die Presssäfte der Bakterien, wie H. Buchner zeigte, in gewissen Fällen heilen können, beruht jedenfalls auf einem Gehalt von Enzym (bezw. Zymogen); denn Protoplasmatheile selbst sind in gut filtrirten, nicht mehr opalisirenden Presssäften nicht anzunehmen, da das organisirte Protoplasma in Wasser nicht löslich ist.

Dass vorzugsweise das Enzym einer bestimmten Art geeignet ist, die Membranen derselben Art aufzulösen, erklärt sich dadurch, dass

---

<sup>1</sup> Ueber Pilzmembranen vgl. auch Wisselingh, *Jahrb. für wissenschaftliche Botanik*. Bd. XXXI. S. 619. Nencki hat gezeigt, dass die Membranen von Fäulnispilzen stickstoffhaltig sind.

Membran wie Enzym Producte ein und desselben Protoplasten sind. Die Configuration der Plasmaproteide<sup>1</sup> bestimmt nicht nur die Tektonik des Protoplasten, sondern auch die Configuration des secernirten Enzyms und endlich die Configuration und Organisation der Membran der Zelle. Es werden also wahrscheinlich Enzym und Membran eine gewisse Molecular-geometrie gemeinsam haben, in Folge dessen ein Eingriff des eigenen Enzyms in die eigene Membran der dasselbe erzeugenden Bakterien- oder Pilzart erleichtert wird, sobald eine gewisse Concentration des secernirten Enzyms erreicht ist.<sup>2</sup> Man könnte der Einfachheit halber die Ausdrücke conform und heteroform einführen. Als conform sind z. B. Stärke mit Diastase, Invertin mit Rohrzucker, als heteroform: Inulin mit Diastase, Emulsin mit Galactan aufzufassen. Conform wäre das Enzym des *Pyocyanus* mit der Membran des Milzbrandbacillus; heteroform das Enzym des *Pyocyanus* mit der Membran des Rothlaufbacillus der Schweine.

Es mag hier noch darauf hingewiesen werden, dass Organismen, welche gewisse Polysaccharide produciren, auch stets die betreffenden Enzyme besitzen, dieselben wieder zu lösen. Thiere oder Pilze, welche Glykogen aufspeichern, besitzen Diastase zu dessen Wiederlösung; Pflanzen, welche Inulin in der Wurzel speichern, produciren auch Inulose, solche, welche Stärke speichern, auch Diastase, und es ist besonders von Interesse, dass das Vorkommen von Amygdalin mit dem des Emulsins (jedoch nicht umgekehrt) zusammengeht, dass das Myrosin sich da findet, wo das myronsaure Kali auch zu spalten ist.

Andererseits beobachten wir allerdings, dass Anpassungserscheinungen die schädlichen Wirkungen der producirtten activen Substanzen auf die eigenen Zellen vermeiden. Die Alexine einer bestimmten Blutart wirken z. B. nur auf die Blutkörperchen mancher anderer Blutarten ein, nicht auf die eigenen.

Dass Alexine und die Blutkörperchen lösende Substanz des Blutes verschiedene Substanzen sind, hat Hahn gezeigt. Dieser Umstand erklärt nun leicht die Thatsache, dass, wie der Eine von uns (Emmerich) zuerst beobachtete, durch Alkalien die Alexinwirkung nach deren Verlust

---

<sup>1</sup> Der Eine von uns (Löw) hat schon früher (1893) bei Discussion der specifischen Giftwirkung auf die Wichtigkeit einer gewissen Configuration der einen specifischen Protoplasten zusammensetzenden Eiweisskörper aufmerksam gemacht. (Natürl. System der Giftwirkungen, Cap. V und VI.)

<sup>2</sup> Hierauf mag auch die Auflösung der Leguminosenbakterien, bezw. der daraus entstehenden Bakteroiden in dem Wurzelgewebe zu beziehen sein. Man schreibt allgemein die Auflösung der Bakteroiden der Thätigkeit der Wurzelzellen zu — wahrscheinlich mit Unrecht.

durch Erwärmen wieder hergestellt werden kann, aber nicht mehr die Blutkörperchen lösende Eigenschaft.<sup>1</sup>

Die Menge des Alexins in einer gegebenen Blutart kann nur sehr minimal sein, wenn man bedenkt, dass die Menge der Bakterien, welche von 1<sup>cem</sup> Blutserum getödtet werden können, nur etwa 500 000 beträgt und dass andererseits bei Erhöhung dieser Zahl die Bakterien üppig im Serum gedeihen. Wie enorm ist jener Alexinwirkung die der „Immunsera“ überlegen! An 29 Millionen Cholerabacillen können, wie wir fanden, von 1<sup>cem</sup> Choleraimmunserum in 24 Stunden vernichtet werden (s. unten).

Die Alexine sind wahrscheinlich auch bakteriolytisch wirkende Enzyme, welche durch Bakterienenzyme leicht zerstört werden, wenn die Bakterienaussaat relativ gross ist. Jedenfalls kann nicht das gesammte Bluteiweiss für die Alexinwirkung verantwortlich gemacht werden.

Es ist ferner auch wohl denkbar, dass eine Bakterienart geradezu die lösende Wirkung einer anderen in einem Thierkörper aufheben kann, oder dass dieselbe den natürlichen Heilungsvorgang, welcher durch die bakteriolytische Wirkung des von den specifischen Krankheitsbakterien gebildeten Enzyms verursacht ist, aufhält. Dies tritt ein, wenn ein Enzym von der ersteren Art producirt wird, welches das Enzym der zweiten Art zerstört. Dass Enzyme einander zerstören können, ist ja eine öfters gemachte Beobachtung. Wir wollen hier nur auf eine interessante Beobachtung R. Hartig's hinweisen. Wenn die Eiche von zwei bestimmten Parasiten befallen wird, nämlich von *Polyporus ignarius* und *Polyporus chyadeus*, und die Mycelfäden dieser Pilze sich einander im Holze begegnen, so bleibt das im Holze gespeicherte Stärkemehl intact, obgleich jeder dieser Pilze eine energisch Stärkemehl lösende Diastase absondert. Es bleibt hier wohl nur der Schluss übrig, dass die beiden Diastasen in einander eingegriffen, sich vielleicht zu einem Körper verbunden haben, der nun keine Stärke lösende Wirkung mehr hat; die activen Atomgruppen haben eine Umänderung erfahren. Man könnte hier einen allerdings entfernter liegenden Vergleich herbeiziehen, dass nämlich optisch active Antipoden sich zu einer optisch inactiven Verbindung vereinigen.

Ueber die Natur der bakteriolytischen Enzyme werden wir nach dem Abschluss der diesbezüglichen Versuche Näheres mittheilen. Hier sei nur darauf hingewiesen, dass es Enzyme in verschiedenen Gruppen der Proteinstoffe giebt; die einen (wie Diastase des Malzes) ähneln den Peptonen, andere mehr den Albumosen, und auch unter den Nucleoproteiden scheint

---

<sup>1</sup> Letzteres wurde von Flexner (*Medical News*, 1894) constatirt, welcher zugleich die Richtigkeit der ersterwähnten, von R. Emmerich festgestellten Thatsache bestätigte.

es Enzyme zu geben; denn ein derartiges, Blutgerinnung bewirkendes Enzym hat Peckelharing<sup>1</sup> aus Muskeln erhalten.

Bakteriolytische Enzyme sind auch im thierischen und menschlichen Körper stets vorhanden und möglicher Weise beruht auf ihrer Thätigkeit die natürliche Immunität gegen bakterielle Infectionskrankheiten.

Der reine und neutralisirte Magensaft hat nach London<sup>2</sup> eine typische baktericide Wirkung, welche bei einstündiger Digestion bei 55° C. nur dann aufgehoben wird, wenn sich hierbei ein flockiger Niederschlag ausscheidet; auch diese baktericide Wirkung des Magensaftes scheint durch ein Enzym verursacht zu sein. Es ist sehr wahrscheinlich, dass den im Magen, Darm u. s. w. vorhandenen bakteriolytischen Enzymen eine wichtige Rolle bei der natürlichen Immunität zukommt. Das gründliche Studium der bakteriolytischen Enzyme ist auch für die Therapie der Infectionskrankheiten von grossem Belang.

Die Thatsache, dass Bakterien Fermente ausscheiden, welche ihnen selbst schädlich sind und die Bakterien, nachdem die Fermente eine gewisse Concentration erreicht haben, auflösen, haben wir, wie erwähnt, zuerst bei Culturen des *Bacillus pyocyaneus* festgestellt. Derselbe wächst hauptsächlich nur an der Oberfläche der Nährflüssigkeit fort; die in Folge leichten Schüttelns zu Boden sinkenden Bakterienhäute werden immer wieder so vollständig aufgelöst, dass selbst nach 6wöchentlicher Cultur bei 37° C. nur eine kaum wägbare Menge von Bakterienresten vorhanden ist.

Wenn man eine Bouilloncultur von *Bac. pyocyaneus* bei Zimmer-temperatur mehrere Wochen stehen lässt, so sammelt sich am Boden ein zähschleimiger „agglutinirter“ Bodensatz an, der sich bei energischem Schütteln fast vollständig auflöst.

Auch die Thatsache, dass Bouillonculturen von Schweine-Rothlaufbacillen überhaupt nur eine geringe Trübung durch die Bacillen zeigen, welche über ein bestimmtes Maass nicht hinausgeht und nach einigen Tagen zusehends geringer wird, ist darauf zurückzuführen, dass ein Theil der Bacillen stets wieder gelöst wird, während ein anderer näher an der Oberfläche sich durch oxydative Thätigkeit gegen das Enzym wehrt und sich dort vermehren kann.

<sup>1</sup> *Zeitschr. f. physiol. Chemie.* Bd. XXII. S. 245. — Nach Galeotti (*Z. f. physiol. Chemie*, Bd. XXV, S. 48) wäre die immunisirende Substanz in Cholerculturen ein Nucleoproteid. Auch solche Körper können aber Enzymnatur besitzen, welche eben nur vom Vorhandensein gewisser labiler Atomgruppen bedingt ist.

<sup>2</sup> London, *Arch. des sc. biolog.* 1897. Bd. V. p. 417.

Die weitere Ueberlegung nun, dass nach Bouchard<sup>1</sup> die Pyocyaneus-bacillen die Milzbrandbacillen im Organismus zu vernichten vermögen, wie dies Emmerich zuerst für Erysipelkokken und Milzbrand nachgewiesen hatte, sowie die Untersuchungen von Rumpf<sup>2</sup> über die erfolgreiche Behandlung des Typhus abdominalis durch Pyocyaneusculturen veranlassten uns zunächst, quantitative Versuche über die Auflösung der Milzbrandbacillen durch Pyocyaneus-Enzym in vitro anzustellen.

Da es gebräuchlich ist, Enzyme durch die Endsilbe „ase“ schon im Namen zu charakterisiren, so könnte man die bakteriolytischen Enzyme auch als „Nucleasen“ zusammenfassen, da sie die Nucleoproteide des Bakterienplasmas lösen. Wir schlagen vor, dass man diese Bezeichnung „Nucleasen“ in Zukunft für die bakteriolytischen Enzyme allgemein anwenden möge.<sup>3</sup>

Das bakteriolytische Enzym des Bacillus pyocyaneus nennen wir Pyocyanase, zumal dasselbe nicht bloss vom Bac. pyocyaneus stammt, sondern denselben auch auflöst. Ebenso benützen wir die Namen Cholerase, Diphtherase, Typhase u. s. w. für die von den betreffenden Bakterien stammenden Enzyme. Wie wir später noch weiter begründen werden, vermögen sich diese Enzyme der pathogenen Bakterien im Blute mit einem activen, wahrscheinlich aus den Leukocyten stammenden Eiweisskörper zu verbinden.

Den letzteren nennen wir Proteïdin, und die Verbindung desselben mit den Bakterienenzymen Immunproteïdin.

Zur näheren Unterscheidung der verschiedenen Immunproteïdine fügen wir noch die Namen der Bakterienenzyme dazu, unterscheiden also Pyocyanase-Immunproteïdin, Cholerase-Immunproteïdin, Typhase-Immunproteïdin u. s. w.

Diese neue Erkenntniss bestätigt und erweitert die im Jahre 1892 von R. Emmerich und J. Tsuboi<sup>4</sup> aufgestellte Theorie der künstlichen Immunität, nach welcher ein von den pathogenen Bakterien stammender Eiweisskörper im Blute des schutzgeimpften Thieres mit einem activen Eiweisskörper in Verbindung tritt, welcher wahrscheinlich aus vor Kurzem zu Grunde gegangenen, bezw. im Blute aufgelösten Leukocyten stammt.

<sup>1</sup> *Acad. Sciences*, 8. Avril 1888. Von 26 mit Milzbrand tödtlich inficirten und mit Pyocyaneusculturen behandelten Thieren blieben 12 am Leben.

<sup>2</sup> *Jahrbücher der Hamburger Staatskrankenanstalten*. 1896. Bd. IV.

<sup>3</sup> Ein Phosphorsäure abspaltendes Enzym hat Hahn auch im Hefepresssaft nachgewiesen.

<sup>4</sup> Die Natur der Schutz- und Heils substanz des Blutes. *Verhandlungen des Congresses für innere Medicin*. 1892. S. 202 ff. Wiesbaden.

Emmerich und Tsuboi haben diese Ansicht, dass hierbei ein von den Leukocyten stammender, baktericider Eiweisskörper in Betracht komme, im Jahre 1892 zuerst vor allen anderen Autoren, welche später diese Frage bearbeiteten, vertreten, was um so mehr zu bemerken ist, als ihre Namen bei der Discussion dieses, neuerdings so vielseitig bearbeiteten Problems nie citirt werden. Bei der Lösung desselben haben doch Diejenigen ein grosses Verdienst, welche zuerst die richtige Erklärung gegeben haben. Den von den Leukocyten stammenden, baktericiden Eiweisskörper nannten Emmerich und Tsuboi Immunproteïn und die die künstliche Immunität bedingende, baktericide Verbindung beider Eiweisskörper bezeichneten sie als Immunprotoidin. Jetzt wissen wir, dass der „von den pathogenen Bakterien stammende Eiweisskörper“ ein bakteriolytisches Enzym ist und dass das Immunproteïdin noch die bakteriolytischen Eigenschaften dieses Enzyms besitzt.

Auf Grund der Versuche von Bouchard<sup>1</sup> u. A. durften wir erwarten, dass unsere Pyocyaneus-Enzymlösung auch in vitro Milzbrandbacillen vernichten, oder, besser gesagt, auflösen werde. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde in der That alsbald durch das Untersuchungsergebnis bestätigt.

### I. Auflösung von Milzbrandbacillen durch Pyocyaneus-Enzymlösung in vitro.

Am 13. Mai 1898 wird eine kaum stecknadelkopfgrosse Menge Anthraxbacillen von einer 36 Stunden bei 22° C. gewachsenen, aus der Milz eines verendeten Kaninchens hergestellten Nähragar-cultur in 4<sup>cem</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung verrieben und gut gemischt.

Nach ca. 10 Min. werden 0.01, 0.03 und 0.05<sup>cem</sup> dieser Anthraxbacillen - Aufschwemmung in Nährgelatine gebracht und diese in Petrischalen ausgegossen.

Alsdann wurde die Aufschwemmung in mit Wasserstoff gefülltem zu-

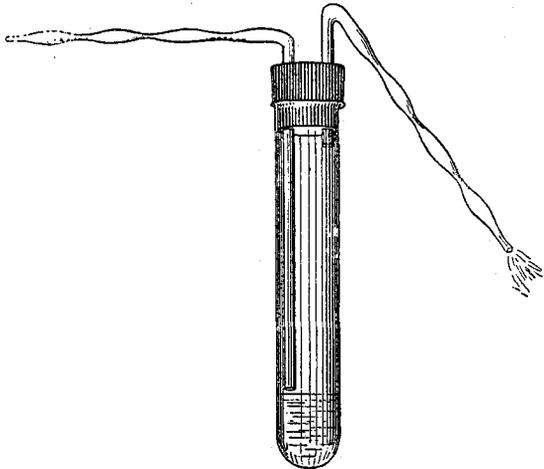


Fig. 1.

<sup>1</sup> *Maladies infectieuses*. 1887—1888.

geschmolzenem Reagenzglas, wie Fig. 1 zeigt, bei 22° C. aufbewahrt und nach 5 und 17 Stunden abermals 0.01, 0.05 und 0.1<sup>ccm</sup> auf Gelatineplatten ausgesät. Nach jeder Probeentnahme wurde wieder Wasserstoff durch das Reagenzglas  $\frac{1}{4}$  Stunde lang durchgeleitet und die beiden Röhren zugeschmolzen.

Das Wasserstoffgas wurde selbstverständlich durch vorgelegte Bleinitrat- und Silbernitratlösung von etwa beigemengtem Schwefelwasserstoff und Arsenwasserstoff gereinigt und dasselbe musste schliesslich noch behufs Entfernung etwa vorhandener Spuren von Sauerstoff zwei mit alkalischer Pyrogallussäure gefüllte Waschflaschen passiren.

Das Resultat war folgendes:

Zeit	1 <sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung enthielt Anthraxbacillen
Sofort nach der Aussaat	40 400
5 Stunden nach der Aussaat	200
17 Stunden nach der Aussaat	0

Dieser Versuch war unter Sauerstoffabschluss ausgeführt worden, weil auch im Thierkörper, namentlich aber im subcutanen Bindegewebe der Sauerstoff den Bakterien keineswegs so leicht zur Verfügung steht, wie bei offenem Luftzutritt. Auf diese wichtige Frage und Versuchsanordnung werden wir späterhin noch eingehender zurückkommen.

Um die Verhältnisse denen des thierischen Organismus noch ähnlicher zu gestalten, wurde bei einem zweiten Versuche die Anthraxbacillen-Aufschwemmung in Pyocyaneus-Enzymlösung bei 37° C., anstatt bei 22° C. (voriger Versuch), aufbewahrt. Gleichzeitig wurde aber auch ein Versuch mit Milzbrandbacillen-Suspension in Pyocyaneus-Enzymlösung bei Sauerstoffzutritt ausgeführt, um zu sehen, ob die Milzbrandbacillen auch unter diesen ungünstigeren Verhältnissen durch das Enzym aufgelöst werden oder nicht.

Ausserdem wurde absichtlich eine ungemein viel grössere Menge von Milzbrandbacillen in der Enzymlösung ausgesät, als beim ersten Versuche.

Das Resultat war folgendes:

Zeit	1 <sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung enthielt Anthraxbacillen	
	bei aërober Aufbewahrung	bei anaërober Aufbewahrung
15. Juni, sofort nach Aussaat	11 060 000	11 060 000
15. „ 4 Stunden nach Aussaat	nicht gezählt	2 133 000
16. „ 24 „ „ „	6 890 000	1 236 000
17. „ 48 „ „ „	nicht gezählt	920 000

(Fortsetzung.)

Z e i t	1 <sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung Anthraxbacillen	
	bei aërober Aufbewahrung	bei anaërober Aufbewahrung
18. Juni, 72 Stunden nach Aussaat	1 376 000	730 000
19. „ 96 „ „ „	654 000	530 000
20. „ 120 „ „ „	329 000	135 000
21. „ 144 „ „ „	0	0
22. „ 168 „ „ „	0	0

Das **Endresultat** war also bei aërober und anaërober Aufbewahrung im Wesentlichen das gleiche. In den ersten 24 Stunden wurden aber bei anaërober Aufbewahrung mehr Milzbrandbacillen aufgelöst, als bei aërober.

Die grosse Verschiedenheit der beim zweiten Versuche in den einzelnen Zeitabschnitten nachgewiesenen Abnahme der Zahl der Anthraxbacillen bei beiden Arten der Aufbewahrung ist unzweifelhaft durch die Art und Weise der Vertheilung der Bacillen in der Flüssigkeit bedingt.

Zu Anfang des Versuches, d. h. in den ersten 24stündigen Zeitabschnitten, werden viel mehr Anthraxbacillen vernichtet als in den späteren, weil zu Anfang die zahlreichen, als Einzelstäbchen oder freie Stäbchenketten in der Pyocyaneusflüssigkeit vertheilten Bakterien leicht und rasch durch das Enzym ausgelöst werden. Späterhin sind nur noch grössere oder kleinere Conglomerate von Bacillen, welche zum Theil sogar noch makroskopisch sichtbar waren, vorhanden, und in diesen sind die central gelagerten Bakterienzellen längere Zeit gegen das Enzym geschützt, so dass sie zunächst nicht, sondern erst später durch dasselbe aufgelöst werden.

Die obigen Versuche wurden mit einer Enzymlösung ausgeführt, welche die Pyocyanase in zu geringer Concentration enthielt. Neuere Versuche haben gezeigt, dass die bakteriolytische Wirkung der Enzymlösung durch die Art ihrer Herstellung ungemein gesteigert werden kann. Von zahlreichen bakteriolytischen Versuchen mit Pyocyanase und Milzbrandbacillen führen wir noch die folgenden an:

Aërobe Aufbewahrung bei 37° C.

„ Zeit	1 <sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung enthielt Milzbrandbac.
Sofort nach der Aussaat	2 895 600
2 Stunden nach der Aussaat	0

## Anaerobe Aufbewahrung bei 37° C.

Zeit	1 <sup>cem</sup> Pyocyanelösung enthielt Milzbrandbacillen
Sofort nach der Aussaat	4 320 000
5 Minuten nach der Aussaat	92 500
2 Stunden nach der Aussaat	0

Diese erstaunlich rasche und energische bakteriolytische Wirkung kann durch weitere Concentration der Pyocyanelösung noch mehr gesteigert werden.

Nach der mikroskopischen Beobachtung eines hängenden Tropfens wird zunächst die Membran der Milzbrandbacillen theilweise aufgelöst, während die ursprüngliche Form der Stäbchen und Fäden, deren Protoplasma gekörnt erscheint, noch lange erkennbar ist. Es ist aber klar, dass nach der Auflösung der Membran Wachstum und Vermehrung nicht mehr möglich sind. Die nach 5 bis 10 Minuten langer Einwirkung einer concentrirten Pyocyanelösung übrig bleibenden Bacillen sind durch die Enzymwirkung sämmtlich stark geschädigt, was an der langsamen Entwicklung und dem verkümmerten Aussehen der Gelatinecolonieen deutlich erkennbar ist.

Nachdem durch diese Versuche nachgewiesen war, dass durch die Pyocyanease grosse Mengen von Milzbrandbacillen ausserhalb des Thierkörpers *in vitro* in kürzester Zeit aufgelöst werden, durften wir erwarten, dass auch die tödtliche Milzbrandinfection bei Versuchsthiereu durch die Einführung der Pyocyanease in den Körper derselben geheilt werden könne.

Da Bouchard den Milzbrand durch die subcutane Injection von lebenden Pyocyaneusbacillen bei Kaninchen mitunter zu heilen vermochte und Wood, Woodhead<sup>1</sup> und Hüppe<sup>2</sup> ein ähnliches Resultat durch die subcutane Injection von sterilisirten Culturen des *Bac. pyocyaneus* erzielten, so war zu erwarten, dass durch die subcutane Injection von Enzymlösung die Heilung von mit Milzbrandbacillen inficirten Thiereu noch viel leichter, sicherer und auf völlig gefahrlose Weise zu erreichen war; denn auch bei den Versuchen von Bouchard, Charrin, Wood, Woodhead und Hüppe wurde die Heilung sicherlich nur durch das in den lebenden und sterilisirten Culturen enthaltene Pyocyaneus-Enzym herbeigeführt. Dasselbe ist aber in unserer völlig keimfreien Enzymlösung in zehnfach grösserer Concentration enthalten als in den Culturen. Ausserdem ist dieselbe frei

<sup>1</sup> *Compt. rend. de l'Acad.* T. CIX. Nr. 26.

<sup>2</sup> *Berliner klin. Wochenschr.* 1889. Nr. 16.

von den Giftstoffen aus den Bakterienzellen, welche in den sterilisirten Culturen der genannten Autoren jedenfalls in grosser Menge enthalten waren und das Versuchsergebnis ungünstig beeinflussten.

## II. Versuche über die Heilung des Milzbrandes durch Pyocyaneus-Enzym (Pyocyanase).

Gleichzeitige Injection von Pyocyaneus-Enzym und Milzbrandbacillen (letztere subcutan).

Versuch 1. Am 26. Februar 1898 werden einem 2266<sup>grm</sup> schweren Kaninchen (Nr. 1) 3<sup>ccm</sup> einer von 600<sup>ccm</sup> auf 50<sup>ccm</sup> bei 20 bis 30° C. im Vacuum eingedampften, dialysirten und durch Chamberlandfilter filtrirten Pyocyaneuscultur in eine Ohrvene injicirt. Gleichzeitig werden 2 Oesen voll Anthrax-Agarcultur (24 Stunden bei 36° C. gewachsen) in 1<sup>ccm</sup> Bouillon aufgeschwemmt und  $\frac{1}{2}$ <sup>ccm</sup> hiervon unter die Rückenhaut injicirt.

Einem 2292<sup>grm</sup> schweren Kaninchen (Nr. 1a), vom gleichen Wurfe wie das vorige, werden zur Controle aus der gleichen Spritze ebenfalls  $\frac{1}{2}$ <sup>ccm</sup> derselben Anthraxbacillen-Aufschwemmung unter die Rückenhaut zur gleichen Zeit eingespritzt.

Am 27. Februar werden dem Kaninchen Nr. 1 nochmals 5<sup>ccm</sup> obgenannter Pyocyaneusflüssigkeit in eine Ohrvene und 3<sup>ccm</sup> derselben subcutan am Rücken injicirt.

Am 28. Februar, früh 9 Uhr, also 43 Stunden nach der Injection, stirbt das Controlkaninchen Nr. 1a. Starkes Milzbrandödem des subcutanen Gewebes an Bauch und Brust, Milz um das Doppelte vergrössert. Im Herzblute, in der Milz, Leber, Nieren sehr viel Milzbrandbacillen. Auf einer mit einem Tropfen Blut besäeten Gelatineplatte wachsen einige 100 Anthraxbacillen-Colonien.

Das Kaninchen Nr. 1 lässt zur gleichen Zeit keinerlei Krankheitserscheinungen erkennen; dasselbe frisst viel Brod und Grünfutter. Nicht die Spur einer Milzbrandgeschwulst (Oedem) ist vorhanden. Dasselbe erhält um 11 Uhr (28. Februar) 4<sup>ccm</sup> obiger Pyocyanaselösung intravenös und ebenso viel subcutan am Rücken.

Aus 0.1<sup>ccm</sup> Blut aus einer Ohrvene entwickeln sich auf zwei Gelatineplatten keine Milzbrandbacillen-Colonien; auch mikroskopisch sind im Blute keine Milzbrandbacillen zu sehen. Nunmehr wird die Behandlung sistirt. Das Kaninchen verhält sich an den folgenden Tagen wie ein gesundes und ist auch am 18. December noch ganz gesund und wohlgenährt. Körpergewicht am 18. März 2324<sup>grm</sup>.

Das Kaninchen ist somit durch die Pyocyaninasejection von einer schweren Milzbrandinfection, ohne irgend einen Schaden, geheilt worden. Injicirt wurden in toto 12<sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung intravenös und 7<sup>ccm</sup> subcutan an 3 auf einander folgenden Tagen.

Versuch 2. Ein gelbes, 1328<sup>grm</sup> schweres Kaninchen erhält am 25. April 1898, Nachmittags 3 Uhr,  $2\frac{1}{2}$ <sup>ccm</sup> Pyocyaneusflüssigkeit (welche jedoch aus Bouillonculturen unter Zusatz von Mannit, im Uebrigen aber, wie

oben beschrieben, bereitet wurde) intravenös und 5<sup>ccm</sup> subcutan. Unmittelbar darnach werden dem Kaninchen 1½<sup>ccm</sup> Milzbrandbacillen-Bouilloncultur (30 Stunden bei 36° C. gewachsen) unter die Rückenhaut injicirt.

Zu gleicher Zeit wurden einem grauen, 2410<sup>grm</sup> schweren Kaninchen zur Controle nur 1.0<sup>ccm</sup> der gleichen Milzbrandbacillen-Bouilloncultur unter die Rückenhaut injicirt.

Am 26. April, Vormittags 10 Uhr, beträgt die Körpertemperatur bei dem behandelten Kaninchen Nr. 2 nur 39.2° C. (normal), beim Controlkaninchen Nr. 2a aber 41.5° C.

Das behandelte Kaninchen Nr. 2, welches schon vor dem Versuche sehr mager und schwächlich war, ist ziemlich matt, weshalb von der intravenösen Infection der Pyocyaneusflüssigkeit abgesehen wird. Dasselbe erhält aber 5<sup>ccm</sup> der Pyocyaneusflüssigkeit subcutan und Nachmittags 4 Uhr nochmals 2<sup>ccm</sup> unter die Haut des Rückens.

Am 27. April, Vormittags 10 Uhr, hat das Controlkaninchen Nr. 2a eine mehr als nussgrosse Geschwulst an der Impfstelle des Rückens, welche sich, flacher werdend, auch über einen Theil des Bauches ausbreitet. Die Körpertemperatur ist 41.6° C.

Das behandelte gelbe Kaninchen Nr. 2 dagegen sieht frischer aus als gestern, frisst viel und die Körpertemperatur beträgt nur 39.8° C. Nicht die Spur einer Geschwulst ist zu bemerken. Dasselbe erhält um 10 Uhr 3½<sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung unter die Rückenhaut.

Das Controlkaninchen Nr. 2a stirbt am 27. April, Abends, etwa 49 Stunden nach der Infection. Bei der Section findet sich eine von der Impfstelle ausgehende ödematöse Geschwulst über dem ganzen Bauch und einem Theil der Brust. Milz sehr vergrößert. Zahlreiche Milzbrandbacillen im Blute und in den Organen.

Am 28. April, früh 10 Uhr, ist das behandelte Kaninchen sehr lebhaft, frisst viel Brod und Grünfutter und hat 39.9° C. Keine Geschwulst an der Impfstelle. Es werden nun nochmals 2⅓ Pyocyanaselösung subcutan injicirt und damit die Behandlung beendet.

An den folgenden Tagen verhält sich das behandelte Kaninchen Nr. 2 ebenso und am 3. Mai beträgt das Körpergewicht 1302<sup>grm</sup>, die Körpertemperatur ist normal. Auch dieses Thier wurde also durch die Pyocyanebehandlung von einer schweren Milzbrandinfection, welcher das viel kräftigere Controlthier innerhalb 49 Stunden erlegen ist, so geheilt, dass zu keiner Zeit unverkennbare Symptome einer Erkrankung zu beobachten waren.

Das Thier lebt auch heute, am 25. December (nach 8 Monaten), noch und ist völlig gesund, kräftig und sehr gut genährt. Subcutan waren im Ganzen 18<sup>ccm</sup>, intravenös nur 2½<sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung injicirt worden.

Versuch 3. Kaninchen Nr. 3, welches 2122<sup>grm</sup> wiegt, erhält am 1. März 1898, Mittags 12 Uhr, 4<sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung in eine Ohrvene.

Um 2½ Uhr Nachmittags werden demselben Thiere 0.5<sup>ccm</sup> einer 12<sup>ccm</sup> betragenden Bouillonprobe, in welcher 5 Oesen einer für Kaninchen sehr virulenten Anthrax-Agarcultur verrieben worden waren, subcutan injicirt.

Einem 2168<sup>grm</sup> schweren Controlkaninchen (Nr. 3a) werden zu gleicher Zeit ebenfalls 0.5<sup>ccm</sup> dieser Milzbrandbacillen-Aufschwemmung subcutan in-

inoculiert. Gleich darauf (3 Uhr) erhält Kaninchen Nr. 3 wiederum 4<sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung intravenös und 3<sup>ccm</sup> subcutan.

Am 3. März, Vormittags 9 Uhr, erhält dieses Kaninchen nochmals 4<sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung intravenös und 3<sup>ccm</sup> subcutan. Bei demselben ist nicht die Spur einer Milzbrandgeschwulst an der Infectionsstelle zu bemerken, während beim Controlkaninchen Nr. 3a eine von der Infectionsstelle ausgehende, über die betreffende Bauchseite bis zur Brust ausgedehnte Infiltration des subcutanen Gewebes fühlbar ist.

Um 5 Uhr Abends, also 51 Stunden nach der Infection, stirbt das Controlthier Nr. 3a, und nun wird auch das behandelte Kaninchen Nr. 3 sofort getödtet, um durch die bakteriologische Untersuchung des Blutes und der Organewebe festzustellen, ob noch Milzbrandbacillen vorhanden sind, oder ob dieselben durch das Pyocyaneus-Enzym bereits gelöst wurden.

Blut-, Milz-, Leber- und Nierenstückchen, sowie bohnen-grosse Theile des subcutanen Gewebes von der Umgebung der Infectionsstelle wurden auf Gelatineplatten und schief erstarrte Nähragarproben zur Aussaat gebracht. Erstere wurden bei 22° C., letztere bei 37° C. aufbewahrt. Auf diesen Nährsubstraten, welche 8 Tage lang beobachtet wurden, kam keine einzige Milzbrandbacillen-Colonie zur Entwicklung. Die enorme Zahl von Milzbrandbacillen, welche durch die subcutane Injection in den Organismus gelangte, war also binnen 51 Stunden vollständig durch das Pyocyaneus-Enzym aufgelöst worden. Bei dem Controlkaninchen Nr. 3a ergab die mikroskopische Untersuchung, dass im Blute und in der Milz grosse Mengen von Milzbrandbacillen vorhanden waren.

Aus diesem Versuchsergebnisse glaubten wir schliessen zu dürfen, dass die Behandlung der mit Milzbrand inoculirten Thiere mit Pyocyaneus-Enzym nicht so lange fortgesetzt zu werden braucht, als dies in den bisherigen Versuchen geschehen war, und dass eine ein- bis zweimalige Injection grösserer Mengen von Pyocyaneus-Enzym genügt, um auch sehr grosse Mengen von Milzbrandbacillen im Organismus aufzulösen und Heilung zu erzielen. Dass dies aber nicht so ist, zeigt der folgende Versuch, bei welchem eine enorme Menge sehr virulenter Anthraxbacillen inoculiert wurde, worauf eine nur dreimalige Injection von Pyocyaneus-Enzymlösung folgte.

Versuch 4. Ein 2314<sup>grm</sup> schweres, schwarzes Kaninchen erhält am 27. April, Nachmittags 4 Uhr, eine subcutane Injection von 1½<sup>ccm</sup> Anthrax-Bouilloncultur. Diese Cultur war ausserordentlich reich an Anthraxbacillen und Sporen, da 6 Stunden vorher 5 grosse Oesen einer Anthrax-Agarcultur in Bouillon gebracht worden waren und diese Bouillon bei 37° C. aufbewahrt wurde. Gleich darauf erhält dieses Kaninchen 5<sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung in eine Ohrvene und 2<sup>ccm</sup> subcutan.

Einem anderen schwarzen, 2328<sup>grm</sup> schweren Controlkaninchen (Nr. 4a) werden zu gleicher Zeit ebenfalls 1½<sup>ccm</sup> derselben Bouilloncultur subcutan inoculiert.

Am 28. April, Vormittags, frisst das behandelte Kaninchen viel und verhält sich ganz normal. Das Controlkaninchen nimmt kein Futter. Um

11 Uhr werden dem ersteren 2<sup>cem</sup> Pyocyaneus-Enzymlösung in eine Ohrvene und 4<sup>cem</sup> derselben subcutan am Rücken injicirt.

Am 29. April, früh 6 $\frac{1}{2}$  Uhr, wird das Controlkaninchen tödt gefunden. Starke Todtenstarre. Der Tod dürfte bald nach Mitternacht erfolgt sein. Dasselbe starb also schon 30 bis 35 Stunden nach der Infection. Grosse Mengen von Milzbrandbacillen im Blute und in den Organen.

Das behandelte Kaninchen frisst und ist sehr munter. Demselben werden zum letzten Male um 10 Uhr Vormittags (29. April) 1<sup>cem</sup> Pyocyaneusflüssigkeit intravenös und 3<sup>cem</sup> subcutan injicirt.

Am 30. April ist dieses Thier scheinbar normal, es frisst viel und ist munter, hat aber 40.0° C. Am 31. April beträgt die Körpertemperatur 40.5° C.

Am 1. Mai, Vormittags 10 Uhr, stirbt das nicht lange genug behandelte Kaninchen. Der Tod trat also genau nach 5 Tagen ein, während das etwas grössere Controlkaninchen schon nach 30 bis 35 Stunden verendet war.

Bei der Section fiel das Fehlen des Milzbrandödems auf. Das subcutane Gewebe der Injectionsstelle zeigte einen ätherigen, apfelähnlichen Geruch. Auf Gelatineplatten, welche mit subcutanem Gewebe beschrift waren, entwickelten sich nur wenig Milzbrandbacillen-Colonien. Zahlreicher waren dieselben auf den mit Herzblut und Milzstückchen besäeten Platten.

Aus diesem letzten Versuche war zu schliessen, dass die Pyocyanease keine immunisirenden Wirkungen hat. Um aber hierüber mit mehr Sicherheit zu entscheiden, führten wir noch den folgenden Versuch aus, bei welchem ein Kaninchen mit Pyocyaneaseinjectionen vorbehandelt und erst 11 Tage nach dieser Vorbehandlung mit Milzbrand inficirt wurde.

### Versuch über die Immunisirung mit Pyocyanease gegen Anthrax.

Ein grosses, weisses, 2715<sup>gramm</sup> schweres Kaninchen erhält am 18. Juni 1898 3.5<sup>cem</sup> Pyocyaneaselösung subcutan. Desgleichen am 20., 22., 24. und am 25. Juni 5<sup>cem</sup> Pyocyanease subcutan, im Ganzen also 19<sup>cem</sup>.

Am 3. Juli, 10 Uhr Vormittags, also 11 Tage nach der letzten Pyocyaneaseinjection, wird das Kaninchen gleichzeitig mit einem ebenso grossen, 2722<sup>gramm</sup> schweren Controlkaninchen in ganz gleicher Weise durch subcutane Injection von 112592000 Anthraxbacillen inficirt. Diese Cultur war sehr virulent.

Am 4. Juli, Vormittags 11 Uhr, beträgt die Körpertemperatur des mit Pyocyanease vorbehandelten Kaninchens 40.7° C., während dieselbe beim Controlkaninchen nur 40.3° C. erreichte. Am 5. Juli, Vormittags 11 Uhr, ist die Körpertemperatur beim behandelten Kaninchen 41.0, beim Controlkaninchen 41.9° C. Das weisse, mit Pyocyaneaseinjectionen vorbehandelte Kaninchen stirbt Abends 6 Uhr, also 56 Stunden nach der Milzbrandinfection, und um 7 Uhr, also 57 Stunden nach der Infection, stirbt das Controlkaninchen. Bei beiden Thieren finden sich bei der Section die charakteristischen Veränderungen des Milzbrandes und zahlreiche Milzbrandbacillen im Blute und in den Organen. Es ist also wohl zweifellos, dass die vor 11 bis 18 Tagen subcutan injicirte Pyocyanease wieder aus dem Thierkörper ausgeschieden oder in demselben zerstört worden war.

### III. Immunisirung von Kaninchen gegen Milzbrand durch Pyocyanase-Immunproteid.

Der vorige Versuch zeigte uns, dass eine eigentliche Immunisirung mit Pyocyanase gegen Milzbrand wenigstens mit eben solchen Quantitäten, welche zur Heilung ausreichen, nicht möglich ist. Vielleicht wäre eine Immunisirung immerhin möglich, wenn man, wie bei Herstellung des Diphtherieserums, die Pyocyanaseinjectionen in steigenden Quantitäten Wochen oder Monate lang hindurch fortsetzen würde.

Der Umstand, dass eine gewisse kleine Quantität Pyocyanase wohl zur Heilung, aber nicht zur Immunisirung ausreicht, führte uns zur Ansicht, dass wohl der grösste Theil der Pyocyanase in den Stoffwechselprocessen des Körpers zu Grunde geht. Nur ein kleiner Theil, in eine haltbarere Form im Thiere übergehend, wird zum immunisirenden Princip. Eine solche haltbarere Form kann nach unserer Ansicht nur dadurch erzielt werden, dass die Pyocyanase sich noch mit einem anderen Eiweisskörper des Thierkörpers, wahrscheinlich von den Leukocyten stammend, zu einem hochmolecularen und trypsinfesten Eiweisskörper verbindet, welcher nicht mehr so leicht in die thierischen Zellen diosmotisch eindringen kann und daher vor dem raschen Zerfall geschützt ist.

Von grösster Wichtigkeit für die Ausführung der künstlichen Immunisirung bei Infectionskrankheiten war es, zu versuchen, ob es gelingt, diese Verbindung künstlich, also ohne Zuhilfenahme des Thierkörpers herzustellen.

Es gelingt nun in der That, nach einer von uns noch genauer zu beschreibenden, chemischen Methode eine bestimmte Menge Pyocyanase oder anderer Bakterien-Enzyme mit bestimmten thierischen Eiweisskörpern in die gewünschte hochmoleculäre Verbindung überzuführen.

Mit diesem künstlich dargestellten Enzym-Immunproteid, mit dessen Reindarstellung wir noch beschäftigt sind, gelingt es, Thiere durch einige Injectionen künstlich zu immunisiren, während man, wie erwähnt, durch einige Injectionen der bakteriolytischen Enzyme nur heilen, nicht aber immunisiren kann. Die Höhe der erzielten Immunität lässt nichts zu wünschen übrig; dagegen müssen über die Dauer derselben noch Versuche ausgeführt werden, da unsere bisherigen (bei Milzbrand u. s. w.) nur auf einen Zeitraum von 14 Tagen ausgedehnt wurden.

Wir lassen hier einen kurzen Bericht über die letzteren folgen

1. Versuche über Immunisirung von Kaninchen gegen Milzbrand durch Injection der Verbindung des Pyocyaneus-Enzyms mit activem Bluteiweiss = Pyocyaneus-Immunproteïdin.

Versuch 1. Am 20. Mai erhält ein grosses, 2480 <sup>erm</sup> schweres, graubraunes Kaninchen 1 $\frac{1}{2}$  <sup>ccm</sup> von künstlich hergestelltem Pyocyaneus-Immunproteïdin, welches durch Berkefeldfilter filtrirt worden war, intravenös (Ohrevene) und 4 <sup>ccm</sup> subcutan. Am 21. und 22. Mai werden dem Thiere 6 <sup>ccm</sup> genannter Blutflüssigkeit subcutan injicirt. Am 23. Mai, Nachmittags 3 Uhr, Injection einer aus 3 Oesen Agarcultur und 10 <sup>ccm</sup> Bouillon hergestellten, sehr virulenten Milzbrandbacillen-Suspension in der Menge von 1 <sup>ccm</sup> unter die Rückenhaut und gleich darauf zum letzten Male 6 <sup>ccm</sup> Pyocyaneus-Enzymblut ebenfalls subcutan. Ein ebenso grosses, 2516 <sup>erm</sup> schweres Controlkaninchen vom gleichen Wurfe erhält die gleiche Menge Milzbrandcultur, welche vorher 5 Mal auf Kaninchen verimpft worden war, subcutan. Nun wird keine Blutflüssigkeit mehr injicirt.

Am 24. Mai fressen beide Thiere und zeigen keine Krankheitserscheinungen. Körpertemperatur beim schutzgeimpften Kaninchen 39.4° C., beim Controlkaninchen 39.7° C. Am 25. Mai, 8 Uhr früh, schutzgeimpftes Kaninchen 40.0, Controlkaninchen 41.6° C. Um 1 Uhr Nachmittags wird das Controlkaninchen todt und in starker Starre gefunden; es starb somit 40 bis 44 Stunden nach der Milzbrandinfection. Bei der Section findet sich ein starkes Milzbrandödem an Bauch und Brust und in Ausstrichpräparaten der sehr bedeutend vergrösserten Milz sind zahllose Milzbrandbacillen. Das schutzgeimpfte Kaninchen hat vom 26. Mai ab ganz normale Temperatur, frisst viel und ist sehr lebhaft; dasselbe nimmt in den folgenden Tagen an Gewicht zu und lebt auch heute noch, am 20. December, also nach 7 Monaten, in bestem Gesundheitszustande.

Die kurze Dauer und die geringe Höhe des Fiebers (nur 40.0° C. während einiger Stunden) beweisen, dass die Wirksamkeit der Schutzimpfung durch Pyocyaneus-Immunproteïdin eine sehr vollkommene war, zumal auch die Fresslust und überhaupt das Allgemeinbefinden des Thieres offenbar nicht gestört waren.

Bei den folgenden Immunisirungsversuchen gegen Milzbrand vermittelst Pyocyaneus-Immunproteïdin wurden die immunisirten Kaninchen erst am 5., 9. und 12. Tage nach der letzten Schutzimpfung mit Milzbrandbacillen inficirt.

Zu den drei ersten Injectionen wurde dieses Pyocyaneus-Immunproteïdin ohne Zusatz irgend eines Desinfectionsmittels verwendet. Die Conservierung geschah durch Aufbewahrung bei 0 bis — 0.5° C. (Wiederholtes Gefrieren schädigte die Wirkung in keiner Weise.) Erst am 8. September, also vor der 4. Schutzimpfung, wurde Toluol zugesetzt.

Die folgende Tabelle enthält die nöthigen Angaben über die Ausführung der Schutzimpfung.

	Injicirt wurde Pyocyanaſe-Immunitätsprotein am:					Zeit u. Stärke der Infection	Resultat
	4. Sept.	6. Sept.	8. Sept.	10. Sept.	12. Sept.		
Nr. 1 Kaninchen, lang- und feinhaarig, 3290 g <sup>grm</sup>	2 ccm intravenös	6 ccm intravenös	2 ccm intravenös		2 ccm intravenös	17. Sept. Vorm. 11 <sup>h</sup> 221 700 Milzbrandbac. subcutan	bleibt am Leben ohne zu erkranken.
	4 ccm subcutan	5 ccm subcutan	7 ccm subcutan	7 ccm subcutan	6 ccm subcutan		
Nr. 2 Kaninchen, graubraun 3580 g <sup>grm</sup>	7 ccm intravenös	3 ccm intravenös	2 ccm intravenös		2 ccm intravenös	21. Sept. Nachm. 5 <sup>h</sup> 280 500 Anthraxbac. subcutan	desgl.
	2 ccm subcutan	6 ccm subcutan	6 ccm subcutan	7 ccm subcutan	6 ccm subcutan		
Nr. 3 Kaninchen, braungelb 3240 g <sup>grm</sup>	6 ccm intravenös	6 ccm intravenös	2 ccm intravenös		2 ccm intravenös	24. Sept. Vorm. 11 <sup>h</sup> 228 470 Anthraxbac. subcutan	desgl.
	2 ccm subcutan	4 ccm subcutan	6 ccm subcutan	8 ccm subcutan	6 ccm subcutan		

Das Controlkaninchen zum schutzgeimpften Kaninchen Nr. 1 stammte von demselben Wurf, wie letzteres. Dieses Controlthier hatte ein Körpergewicht von 3417 g<sup>grm</sup> und erhielt zur gleichen Zeit die gleiche Anzahl von Milzbrandbacillen subcutan injicirt, und zwar wie das schutzgeimpfte Kaninchen Nr. 1 in der Menge von 0.7 ccm einer Bouillonaufschwemmung von 24 Stunden bei 37° C. gewachsener, direct aus Milz gezüchteter Agarcultur. Diese Anthraxcultur war 14 Mal in kurzen Intervallen durch den Kaninchenkörper gegangen; dieselbe war so virulent, dass, wie ein anderer Versuch zeigte, 11 500 Milzbrandbacillen den Tod eines grossen Kaninchens in 38 Stunden herbeiführten. Das schutzgeimpfte Kaninchen wurde also zum mindesten mit dem 20fachen, wahrscheinlich sogar mit dem 2000fachen der tödtlichen Dosis inficirt. Das Controlkaninchen starb schon 34 bis 36 Stunden nach der Infection mit Milzbrandbacillen. 24 Stunden nach der Infection mit Anthrax betrug die Körpertemperatur beim Controlkaninchen bereits 40.4° C., während dieselbe beim schutzgeimpften Kaninchen Nr. 1 noch normal (39.4° C.) war. Beim Controlkaninchen ist eine deutliche Milzbrandgeschwulst an der Injectionsstelle zu fühlen, während bei dem schutzgeimpften Kaninchen keine Spur einer solchen wahrnehmbar ist. Erst Abends 5 Uhr ist die Körpertemperatur des schutzgeimpften Kaninchens Nr. 1 etwas erhöht: 39.8, während die des Controlkaninchens 41.2° C. beträgt. Das letztere stirbt zwischen 8 und 12 Uhr Nachts an schwerem Milzbrand (nach dem Sectionsergebniss u. s. w.). Das schutzgeimpfte Kaninchen Nr. 1 dagegen verhält sich von nun ab ganz normal; die Körpertemperatur ist 39.3° C. Das Thier frisst viel und ist auch heute, am 29. November, völlig gesund.

Das schutzgeimpfte Kaninchen Nr. 2 (graubraun, 3580 g<sup>grm</sup> Körpergewicht) wurde 9 Tage nach der letzten Schutzimpfung in genau der gleichen Weise, wie das 3894 g<sup>grm</sup> schwere Controlkaninchen, mit Anthraxbacillen inficirt; jedes der Thiere erhielt 280 500 Milzbrandbacillen subcutan. Die letzteren waren

aus Milz auf Agar 24 Stunden bei 36° C. gezüchtet und es genügten sicherlich 100 bis 1000 Bacillen, um eine tödtliche Infection beim Kaninchen zu verursachen. 24 Stunden nach der Infection (22. September, Nachmittags 4 Uhr) ist beim Controlkaninchen ein deutliches Oedem an der Injectionsstelle wahrnehmbar und die Körpertemperatur beträgt 40.6° C. Das schutzgeimpfte Kaninchen Nr. 2 dagegen hat keine Spur einer Milzbrandgeschwulst und die Körpertemperatur ist normal (39.3° C.).

Am 23. September, früh 8 Uhr, also 39 Stunden nach der Injection mit Anthrax, stirbt das Controlkaninchen an typischem Milzbrand.

Das schutzgeimpfte Kaninchen zeigte im Laufe der nächsten Tage keinerlei Krankheitserscheinungen, die Körpertemperatur war jeder Zeit normal und auch heute, am 29. November, ist das Thier ganz gesund und frisch, die Körpertemperatur ist normal (39.4° C.).

Das Kaninchen Nr. 3 (braungelb), 3240 <sup>g</sup>mm schwer, wurde erst am 24. September, Vormittags 11 Uhr, also 12 Tage nach der letzten Schutzimpfung, mit 228 470 Milzbrandbacillen durch subcutane Injection von 0.7 <sup>ccm</sup> einer Bouillonaufschwemmung einer 24 Stunden bei 36° C. aus Milz gezüchteten Agarcultur inficirt. Diese Cultur war durch 15 Kaninchen hindurch geführt worden und daher ausserordentlich virulent. Höchst wahrscheinlich hätte ein einziger Milzbrandbacillus genügt, um ein Kaninchen zu tödten. Hierfür spricht auch der rasche Tod des 3642 <sup>g</sup>mm schweren, gelben Controlkaninchens, welches mit genau der gleichen Culturmenge, aus der gleichen Spritzenfüllung und zur selben Zeit wie Kaninchen Nr. 3 mit 228 470 Milzbrandbacillen durch subcutane Injection inficirt wurde. Dieses Controlkaninchen verendete schon am 25. September, Abends 7 Uhr, also schon 31½ Stunden nach der Infection, an schwerem Milzbrand. Das Milzbrandödem an der Impfstelle hatte kaum Zeit, sich auszubilden und war daher nur 3-Markstück gross; auch die Milz war nur wenig vergrößert. In jedem Ausstrichpräparate von Milzsaft waren aber ausserordentlich viele Milzbrandbacillen, welche sich nach der von Czaplowski<sup>1</sup> modificirten Gram'schen Methode fast durchweg intensiv und gleichmässig dunkelblau färbten, während roth gefärbte, todte Bacillen nicht zu sehen waren. Das schutzgeimpfte Kaninchen Nr. 3 hatte beim Tode des Controlthieres (25. September, Abends 7 Uhr) nur ganz wenig erhöhte Körpertemperatur, nämlich 39.8° C. Schon am nächsten Morgen war die Körpertemperatur wieder normal und blieb es auch bis heute (29. September, Vormittags 8 Uhr). An der Infectionsstelle ist nicht die Spur von Schwellung (Oedem) zu constatiren. Das Thier verhält sich an den folgenden Tagen, bei unverminderter Fresslust, völlig normal.

Diese Versuche zeigen, dass selbst eine Milzbrandinfection mit der mehr als 1000fachen (wahrscheinlich sogar mit der 200 000fachen) tödtlichen Dosis vollvirulenter Milzbrandbacillen vom schutzgeimpften Thierkörper leicht und gänzlich schadlos für denselben überwunden wird.

<sup>1</sup> *Hygienische Rundschau*. 1896. S. 1029.

Führt man die Schutzimpfung mit Pyocyanase-Immunproteïdin aus, zu dessen Bereitung, wie bei dem oben verwendeten, mehrere Wochen alte Pyocyanase benutzt wurde, dann ist auch die Schutzimpfung ohne jede schädliche Wirkung für die Thiere. Dieselben zeigen dann zu keiner Zeit auch nur die geringsten Zeichen von Unbehagen oder gar von Kranksein, da sowohl die pyogenen Proteïne, als auch die aus den Leibern der Bakterien stammenden Giftstoffe bei mehrwöchentlichem Stehen der Pyocyanase-lösung durch das bakteriolytische Enzym zersetzt, d. h. in unschädliche Verbindungen übergeführt werden. Da eines der schutzgeimpften Kaninchen auch 12 Tage nach der letzten Schutzimpfung gegen die 200 000fache tödtliche Dosis von Milzbrandbacillen noch völlig immun war, so ist es höchst wahrscheinlich, dass die Immunität mindestens mehrere Wochen in solcher Höhe andauert, dass eine spontane (natürliche) Infection auch nach dieser Zeit leicht verhütet wird.

Das Impfungsverfahren mit Pyocyanase-Immunproteïdin wird sich daher voraussichtlich nicht nur zur erfolgreichen Behandlung des Milzbrandes bei Schafen, Rindvieh u. s. w., sondern auch zur Schutzimpfung dieser Thiere eignen. Jedenfalls wird man eine in einem Stalle ausgebrochene Milzbrandepidemie durch Pyocyanase-Immunproteïdin-Injectionen bei den erkrankten und noch gesunden Thieren des Stalles zum Stillstand bringen können. Auch zur Behandlung des Milzbrandes beim Menschen wird man das Pyocyanase-Immunproteïdin anwenden.

## 2. Schutzimpfung mit Pyocyanase-Milz-Immunproteïdin gegen Milzbrand.

Noch wirksamer und einfacher scheint die Anwendung von Pyocyanase-Immunproteïdin, welches unter Benutzung von Organeiwëiss hergestellt wird, zur Schutzimpfung gegen Milzbrand zu sein.

Die vermitteltst Organeiwëiss hergestellten Präparate haben den grossen Vortheil, dass die Pyocyanase viel weniger stark (nahezu gar nicht) verdünnt wird, als bei der Anwendung von Blut zur Immunproteïdinbereitung.

Mit einer solchen Verbindung von Organeiwëiss und Pyocyanase (Pyocyanase-Immunproteïdin) wurde ein gelbes, 3015 <sup>g</sup> schweres Kaninchen schutzgeimpft, welches vom gleichen Wurfe stammte, wie das auf S. 22 erwähnte, 3642 <sup>g</sup> schwere Controlkaninchen. Letzteres diente zugleich als Controlthier für diesen Versuch.

Die Schutzimpfung wurde wie folgt ausgeführt.

Das Kaninchen erhielt am

17. September	2 <sup>ccm</sup>	intravenös
	5 "	subcutan
18. "	8 "	"
19. "	7 "	"
20. "	1 "	intravenös
	4 "	subcutan
21. "	6 "	"

Das Thier zeigte während der Schutzimpfung keinerlei Störung des Wohlbefindens, es war stets sehr lebhaft, frass viel, namentlich auch gleich nach einer Injection von Immunproteid<sup>in</sup>, wie überhaupt zu jeder Zeit, wenn ihm Futter vorgeworfen wurde.

Am 24. September, Vormittags 11 Uhr, also 3 Tage nach der letzten Schutzimpfung, wird dieses Kaninchen gleichzeitig mit dem auf S. 22 erwähnten Kaninchen Nr. 3 und dem auch zur Controle für diesen Versuch bestimmten, gelben, 3642<sup>gmm</sup> schweren Controlkaninchen mit 228 470 Milzbrandbacillen (in 0.7<sup>ccm</sup> Bouillon aufgeschwemmt) durch subcutane Injection inficirt. Während dieses Controlkaninchen, wie schon erwähnt, schon 31 $\frac{1}{2}$  Stunden (25. September, Abends 7 Uhr) nach der Infection an schwerem Milzbrand verendete, zeigte das mit Pyocyanase-Immunproteid<sup>in</sup> schutzgeimpfte Kaninchen in der Folge nicht die geringste Störung, weder hinsichtlich der Lebhaftigkeit, noch in Bezug auf die Fresslust. Nur ganz vorübergehend war die Körpertemperatur um einige Zehntelgrade erhöht. Dieselbe betrug nämlich am 26. September, Vormittags 10 Uhr, 39.8° C., war aber vom 27. September, Vormittags 8 Uhr, an wieder völlig normal (39.3 bis 39.4° C.). Eine Veränderung an der Injectionsstelle war nie zu bemerken. Das Thier ist, trotz der Injection einer so grossen Menge höchst virulenter Milzbrandbacillen, auch heute (29. November) noch völlig gesund.

Mit derselben Verbindung der Pyocyanase mit Organeiw<sup>eiss</sup> wurde am 24. October 1898 ein 3122<sup>gmm</sup> schweres, graublaues Kaninchen wie folgt schutzgeimpft.

Das Thier erhielt am 24. October	1 <sup>ccm</sup>	intravenös
	2 "	subcutan
25. "	2 "	intravenös
	2 "	subcutan
26. "	6 "	"
27. "	4 "	"
28. "	1 "	intravenös
	4 "	subcutan.

Am 3. November, 10 Uhr Vormittags, also 6 Tage nach der letzten Schutzimpfung, werden diesem Kaninchen 562 400 Milzbrandbacillen (von einer vollvirulenten Agarcultur, die 15 Mal durch den Kaninchenkörper gegangen war) subcu an injicirt. Die gleiche Menge Milzbrandbacilleu wird zur gleichen Zeit einem 3256<sup>gmm</sup> schweren, graubraunen Kaninchen injicirt. Das letztere wird schon am 4. November, Abends 7 Uhr, also 33 Stunden nach der Infection, todt gefunden. Das schutzgeimpfte Kaninchen hatte zu dieser Zeit 39.7° C. und war frisch und munter. Dasselbe lebt heute noch (29. November 1898).

#### IV. Milzbrandheilung durch Injection der aus der Pyocyaneus-cultur gefällten und über Schwefelsäure getrockneten Pyocyanase.

Für die praktische Verwerthung der neuen Heilmethode beim Milzbrand des Menschen und der Thiere (Rindvieh, Schafe u. s. w.), sowie eventuell bei Typhus, Pest und anderen Infectionskrankheiten, war es nothwendig, die Pyocyanase in haltbarer Form zu gewinnen. Wenn dies auch wohl durch Zusatz von entwicklungshemmenden Mitteln, wie Chloroform, Toluol u. s. w., zur Pyocyanaselösung möglich wäre, so sind Flüssigkeiten für den Versandt doch nicht so geeignet, wie eine trockene Substanz, welche leicht löslich und dosirbar ist.

Es war zunächst festzustellen, ob die gefällte und getrocknete Pyocyanase noch ihre volle Wirksamkeit besitzt.

Es zeigte sich zunächst, dass sich dieselbe schon in sehr geringen Mengen destillirten Wassers leicht und vollständig löst.

Versetzt man die Lösung in destillirtem Wasser mit schwach alkalisch gemachter Wasserstoffsuperoxydlösung, so entsteht entweder eine so ausserordentlich stürmische Sauerstoffgasentwicklung, dass ein Theil der Flüssigkeit aus dem Reagensglase herausgeschleudert wird, oder aber die Sauerstoffentwicklung ist weniger stürmisch, aber immerhin sehr lebhaft und von um so längerer Dauer.

Wenn die Ausfällung und Trocknung der Pyocyanase unter Anwendung sterilisirter Gefässe u. s. w. möglichst reinlich vollzogen wurde, so kann die Lösung in sterilisirtem Wasser direct therapeutisch verwendet werden.

Versuch 1. Am 1. December 1898, Mittags 12 Uhr, werden einem schlecht genährten, schwächlichen, graubraunen Kaninchen von nur 1216 <sup>grm</sup> Körpergewicht 5 328 000 Milzbrandbacillen, in 0.5 <sup>ccm</sup> Bouillon aufgeschwemmt, subcutan am Rücken injicirt.

Diese Milzbrandbacillen waren innerhalb einiger Monate 15 Mal durch den Kaninchenkörper gegangen und die Cultur stets in Sporenform weitergeführt worden, so dass der einmal erworbene Virulenzgrad erhalten blieb. Höchst wahrscheinlich genügte ein einziger Bacillus von dieser Cultur zur tödtlichen Infection bei Kaninchen.

Einem sehr kräftigen und gut genährten, 2 Monate hindurch im Freien gehaltenen, schwarzen Kaninchen wurden zur Controle von derselben Cultur ebenfalls 5 328 000 Milzbrandbacillen zur gleichen Zeit subcutan am Rücken injicirt.

Das ersterwähnte Kaninchen erhielt gleich nach der Milzbrandbacillen-Injection 0.5 <sup>ccm</sup> einer aus 1 <sup>grm</sup> trockener Pyocyanasemasse und 3 <sup>ccm</sup> Wasser bereiteten Lösung intravenös und 2 1/2 <sup>ccm</sup> subcutan. Von dieser Masse bestanden mehr als 99 Procent aus Salzen und anderen Stoffen.

Am 2. December, 10 Uhr Vormittags, hat das schwarze Controlkaninchen 41.0° C. und das mit Pyocyanase behandelte graubraune Kaninchen nur

39.7° C. Um diese Zeit werden demselben nochmals 0.5<sup>ccm</sup> der gleich bereiteten Pyocyanaselösung intravenös und 1½<sup>ccm</sup> derselben subcutan injicirt.

Am 2. December, Abends zwischen 6 und 7 Uhr, also 30 bis 31 Stunden nach der Injection, stirbt das schwarze Controlkaninchen.

Bei der Section findet sich ein kleines, nur thalergrösses Milzbrandödem an der Injectionsstelle. Die Milz ist ziemlich stark vergrössert und enthält, ebenso wie das Blut, grosse Mengen von Milzbrandbacillen.

Das mit Pyocyanase behandelte, schwächliche Kaninchen lebt dagegen am 3. December, Vormittags 11 Uhr, und hat nur 39.6° C. Körpertemperatur. Dasselbe ist ganz munter und frisst Brod und Grünfutter. Es erhält nun nochmals, jedoch nur noch subcutan, 2<sup>ccm</sup> der, wie oben erwähnt, bereiteten Pyocyanaselösung, und damit wird die Behandlung beendet. Auch am 4. December ist das Thier frisch und munter und frisst viel.

Am 9. December stirbt das Kaninchen, welches am linken Ohrgrund eine eiternde Bisswunde hatte, an Kaninchensepticämie. Bei der Section zeigen sich nicht die geringsten Spuren der Milzbrandinfection. Im Herzblute und in der Milz sind sehr viel Kaninchensepticämiebakterien, aber keine Milzbrandbacillen mikroskopisch nachweisbar; auch auf mit Milz und Blut besäeten Gelatineplatten wachsen nur Colonien von Kaninchensepticämiebacillen. Dieser Versuch wurde in allen Details von Hrn. Prof. Dr. H. Buchner und von Hrn. Dr. Megele verfolgt.

Versuch 2. Am 5. December, Vormittags 10 Uhr, werden 3 Kaninchen, ein gelbbraunes, 3014<sup>gmm</sup> schwer, ein schwarzes, 3202<sup>gmm</sup> schwer, und ein graubraunes Controlkaninchen von 3258<sup>gmm</sup> Körpergewicht mit je 817300 Milzbrandbacillen, welche aus der Milz des im vorigen Versuche erwähnten Controlkaninchens gezüchtet worden waren, durch subcutane Injection inficirt. Das gelbbraune Kaninchen erhält 4 und das schwarze Kaninchen 5 Stunden nach der Milzbrandbacillen-Injection intravenös 0.5<sup>ccm</sup> der, wie oben erwähnt, bereiteten Lösung von trockener Pyocyanase und 1½<sup>ccm</sup> subcutan.

Am 6. December, Vormittags 8 Uhr, hat das Controlkaninchen 41.6, das mit Pyocyanase behandelte gelbbraune Kaninchen 39.8 und das schwarze 39.9° C. Die beiden letztgenannten Thiere erhalten nun nochmals genau ebenso wie gestern Pyocyanaseinjectionen intravenös je 0.5<sup>ccm</sup> und subcutan je 1½<sup>ccm</sup>. Abends ¾ Uhr, also 29 Stunden nach der Milzbrandinfection, stirbt das graubraune Controlkaninchen. Bei dem gelbbraunen Kaninchen beträgt am 7. December Vormittags die Körpertemperatur 39.6, bei dem schwarzen 39.8° C. Die Pyocyanaseinjection wird nun nochmals ganz ebenso wie am 6. December bei den Thieren ausgeführt.

Dieselben zeigten, eine geringe Infiltration des subcutanen Gewebes an der Injectionsstelle ausgenommen, keinerlei Krankheitserscheinungen.

Dieselben sind auch heute, am 18. December, vollkommen gesund.

Auf Grund dieser prompten Resultate konnte von weiteren Versuchen mit getrockneter Pyocyanase abgesehen werden.

Der eine von uns (Emmerich) hat in Bezug auf Milzbrand-Heilversuchen viele Erfahrungen zu machen Gelegenheit gehabt. Derselbe hat im Jahre 1886 als Erster gezeigt, dass es möglich ist, die Milzbrandinfection bei Kaninchen durch Injectionen von Erysipel-Streptokokken, welche eine für

Kaninchen weniger gefährliche Krankheit verursachen, zu heilen; er hat dann weiterhin nach dem Vorgange Bouchard's auch Versuche über die Heilung des Milzbrandes durch Injection von *Pyocyaneusbacillen*, sowie auch durch Injection des Blutserums von mit Erysipelstreptokokken vorbehandelten Schafen angestellt. Die Resultate all dieser Versuche werden aber von denjenigen, welche mit gefällter, getrockneter und wieder gelöster *Pyocyanase* erzielt wurden, durch die absolute Sicherheit des Heilresultates weit übertroffen. Während von den Milzbrand-Heilversuchen mit Streptokokken- und *Pyocyaneusculturen* v. Pettenkofer mit Recht sagen konnte, „das heisst man den Teufel durch den Beelzebub austreiben,“ scheint die *Pyocyanase*behandlung ganz unschädlich zu sein, da die Thiere während der Behandlung und trotz Einführung enormer Mengen vollvirulenter Milzbrandbacillen keinerlei hervorstechende Krankheitserscheinungen und auch keine Störung des Ernährungszustandes zeigen. Im Gegentheil, die Versuchsthierc zeichnen sich nach Durchführung der Behandlung durch grossen Appetit aus und lassen sich leicht mästen, ein Umstand, der in Bezug auf die praktische Durchführbarkeit der Heilmethode bei Schafen, Rindvieh u. s. w. sehr in's Gewicht fällt.

Keines der bis jetzt zur Heilung des Milzbrandes vorgeschlagenen Mittel lässt sich in Bezug auf die Sicherheit des Erfolges mit der vorzüglichen Wirkung der durch Fällung gereinigten und von lebensfähigen Keimen befreiten *Pyocyanase* vergleichen.

Wir glauben, dass wir in derselben ein rationelles Heilmittel für den Milzbrand des Menschen und der Thiere gefunden haben, welches, wenn es auch beim Menschen und den grösseren Thieren keine ungünstigen Nebenerscheinungen verursacht, alle anderen Milzbrand-Heilmittel weit übertrifft.

Charrin<sup>1</sup> beobachtete, dass die „Stoffwechselproducte“ des *Bacillus pyocyaneus* bei Kaninchen eine an die spinale Epilepsie erinnernde Nervenkrankheit, ferner Albuminurie und unter der Haut auch Entzündung oder Oedem erzeugten. Die Hauptwirkung ist die Lähmung der Centren der vasomotorischen Nerven, und nach Charrin und Gley<sup>2</sup> sind es besonders die flüchtigen Stoffwechselproducte des *Bac. pyocyaneus*, welche diese spezielle Wirkung äussern.

Dass diese letzterwähnte, sehr bedenkliche Wirkung bei der intravenösen und subcutanen Injection unserer *Pyocyanase* oder des *Pyocyanase-Immunproteidins* niemals eintrat, wäre also damit zu erklären, dass beim Eindampfen der *Pyocyaneusculturen* im Vacuum diese flüchtigen, deletären

<sup>1</sup> *Compt rend. de la soc. de Biol.* 1891, 1893 und 1895.

<sup>2</sup> *Ebenda.* 1891.

Producte ganz oder doch grösstentheils abdestillirt und entfernt werden. In der That hat das Destillat den so charakteristischen Jasmingeruch der *Pyocyaneusculturen* in hohem Maasse, während die im Vacuum concentrirte *Pyocyanelösung* kaum mehr aromatisch, sondern leimartig riecht. Aber auch keine der übrigen, von Charrin geschilderten Erscheinungen, wie nervöse Störungen, Albuminurie u. s. w., sind von uns bei der intravenösen und subcutanen Injection sehr grosser Mengen der *Pyocyanelösung* beobachtet worden. Es ist somit wahrscheinlich, dass die giftigen Producte, welche jene Störungen hervorrufen, bei der Dialyse der im Vacuum concentrirten Culturen entfernt wurden, so dass unsere *Pyocyanelösung* als giftfrei zu bezeichnen wäre.

Wenn man bedenkt, dass wir einzelnen Kaninchen auf einmal 5<sup>cem</sup> *Pyocyanelösung* intravenös und ebenso viel subcutan injicirten und dass die in mehreren auf einander folgenden Tagen injicirte Gesamtmenge der *Pyocyanelösung* bis zu 30<sup>cem</sup> betrug, ohne dass ernstliche Krankheitserscheinungen auftraten, so kann von einer Giftwirkung kaum die Rede sein.

Im Gegensatz zu den „Stoffwechselproducten“ der meisten anderen pathogenen Bakterienarten sind diejenigen des *Bac. pyocyaneus* bei subcutaner Injection gefährlicher, als bei intravenöser, und die Kaninchen sterben nach ersterer früherer als nach letzterer. Charrin beobachtete, dass die Thiere manchmal sehr spät, einmal eines erst nach 4 Monaten durch Degeneration der Leber starben. Derartiges konnten wir nach der *Pyocyaneinjection* ebenfalls nicht beobachten. Es sind noch jetzt einige unserer Kaninchen in bestem Gesundheitszustande am Leben, welche vor 8 Monaten durch *Pyocyaneinjectionen* von tödtlichen Milzbrandinfectionen geheilt wurden. Es dürfte übrigens schwer festzustellen sein, ob Charrin's so spät eingegangene Kaninchen wirklich in Folge der Injection von Stoffwechselproducten des *Bac. pyocyaneus* oder durch andere Ursachen verendet sind.

Wir konnten im Allgemeinen nur eine, allerdings sehr heftige Wirkung der subcutanen Injection von *Pyocyane-* oder von *Pyocyane-Immunproteïnlösung* constatiren, nämlich eine von der Injectionsstelle ausgehende Eiterbildung, welche in einigen Fällen eine ganz bedeutende Ausdehnung erreichte. Diese Eiterung war aber nur dann zu beobachten, wenn die zur Herstellung der *Pyocyane-* oder *Pyocyane-Immunproteïnlösung* verwendeten, im Vacuum concentrirten *Pyocyaneusculturen* nicht durch Berkefeld- oder Chamberlandfilter filtrirt worden waren. Die profuse Eiterung war in diesem Falle offenbar durch die Proteïne der massenhaft injicirten Bakterienzellen verursacht, welche, durch Toluol abgetödtet, im subcutanen Gewebe aufgelöst wurden und so ihre pyogenen Wirkungen

entfalten konnten. Auch nach Charrin sind die Toxine hauptsächlich in den Bacillen selbst enthalten und er beobachtete nach der Injection der todtten Bacillen viel intensivere Veränderungen, als nach der Injection der „Stoffwechselproducte“.

**V. Auflösung von anderen Bakterienarten durch das Pyocyaneus-Enzym in vitro.**

Freudenreich<sup>1</sup> hatte schon im Jahre 1889 beobachtet, dass die Culturen des Pyocyaneus das Wachstum anderer Mikroben, z. B. Typhus- und Cholerabacillen, ungünstig beeinflussten. Er stellte aber keine quantitativen Untersuchungen über Abtödtung dieser Bakterien an. Weiterhin hat, wie schon erwähnt, Rumpf<sup>2</sup> den Typhus abdominalis durch Injection von abgetödteten Pyocyaneusculturen günstig beeinflussen können.

Es lag daher nahe, zunächst Versuche über den lösenden Einfluss der Pyocyanase auf Typhusbacillen anzustellen. Beim ersten Versuche wurden 153 000 000 Typhusbacillen von einer 24stündigen Agarcultur pro 1<sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung ausgesäet und letztere, welche aus 6<sup>ccm</sup> bestand, in zwei Theile, einen aëroben und einen anaëroben, getheilt, welche beide bei 37° C. aufbewahrt wurden. Während in der aëroben Probe nach 24 Stunden eine bedeutende Vermehrung der Typhusbacillen zu constatiren war, ergab die Zählung bei der anaërob aufbewahrten Probe nach 24 Stunden die Zahl 154 880 000 pro 1<sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung, so dass also weder Vermehrung, noch Abnahme eingetreten war. Ein wesentlich verschiedenes Resultat lieferte aber der nächste Versuch, bei welchem einerseits eine andere Cultur des Bac. pyocyaneus Verwendung fand und andererseits die Aussat eine weit geringere war.

**Auflösung von Typhusbacillen in Pyocyanaselösung.**

D a t u m	a) Aërobe Aufbewahrung	b) Anaërobe Aufbewahrung
	1 <sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung enthält Typhusbacillen	1 <sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung enthält Typhusbacillen
25. Juli sofort nach Aussaat	29 040 000	29 040 000
27. Juli nach 48 Stunden bei 37° C.	4 710 000	172 350
28. Juli nach 72 Stunden bei 37° C.	0	0

<sup>1</sup> Baumgarten's *Jahresbericht*. 1889.

<sup>2</sup> *Jahrbücher der Hamburger Staatskrankenanstalten*. 1896. Bd. IV.

Versuche, welche neuerdings angestellt wurden, ergaben noch wesentlich günstigere Resultate, was auf die Verbesserung der Methode der Enzymdarstellung zurückzuführen ist.

Auf Grund dieser Resultate können wir wohl die Erfolge Rumpf's verstehen. Kraus und Busweil<sup>1</sup> sowohl, als auch Presser<sup>2</sup> haben allerdings bei ihren Heilversuchen an Typhuskranken mit abgetödteten Culturen des *Pyocyaneus* und Presser auch bei Injectionen von abgetödteten Culturen des *Typhusbacillus* selbst angeblich keine Erfolge erzielt.

Da alle diese Autoren die nicht concentrirten, weder durch Dialyse gereinigten, noch filtrirten *Pyocyaneuseulturen* anwendeten und andererseits grosse Unterschiede in der Enzyymbildung bei verschiedenen Varietäten des *Pyocyaneus* nach unseren Erfahrungen zu beobachten sind, so glauben wir, dass die negativen Resultate von Kraus, Busweil und Presser bedeutungslos sind. Rumpf's positive Ergebnisse aber und unsere obigen Zahlen, welche eine so energische, auflösende Wirkung der *Pyocyanase* auf *Typhusbacillen* ergeben, lassen die Hoffnung als berechtigt erscheinen, dass eine neue und erfolgreiche Behandlung des Typhus mit der gereinigten und concentrirten *Pyocyanase* möglich sein und bald praktische Anwendung finden wird.

Besondere Beachtung verdient die Thatsache, dass die *Pyocyanase* bei anaërober Aufbewahrung *Typhusbacillen* viel rascher abtödtet, als bei aërober. Im thierischen und menschlichen Organismus wird daher die Wirkung der *Pyocyanase* auf die pathogenen Bakterien viel energischer sein, als in vitro, zumal in ersteren auch noch die Vertheilung der Bakterienconglomerate und -Verbände durch den Blutstrom zu Einzelzellen, sowie in der Bauchhöhle die Wirkung der Darmperistaltik im gleichen Sinne und andere, die Abtödtung begünstigende Momente hinzukommen.

Unsere nächsten Versuche galten dem Verhalten der *Cholera*bacillen in *Pyocyanase*:

D a t u m	A ä r o b	A n a ä r o b
	1 ccm <i>Pyocyanaselösung</i> enthält <i>Cholera</i> bacillen	
15. Juni sofort nach Aussaat	132 160 000	132 160 000
16. „ nach 24 Std. bei 37°C.	44 373 000	11 300 000
17. „ „ 48 „ „	war 24 Std. bei Zimmertemp.	1 663 000
18. „ „ 72 „ „	49 540 000	757 000
19. „ „ 96 „ „		172 090

<sup>1</sup> *Wiener klin. Wochenschrift.* 1894.

<sup>2</sup> *Zeitschrift für Heilkunde.* 1895. Bd. XVI.

Dieses Resultat beweist wieder den grossen Unterschied bei aërober und anaërober Behandlung. Die zum obigen Versuche verwendete Pyocyanaselösung war nach einer noch sehr unvollkommenen Methode gewonnen. Es ist bestimmt anzunehmen, dass die neuerdings von uns hergestellte Enzymlösung viel energischere Wirkungen entfaltet. Eine ganz eminente auflösende Wirkung zeigte die Pyocyanase für Diphtheriebacillen.

Diphtheriebacillen von sehr virulenter Zuckerserumcultur wurden in 6<sup>cem</sup> Pyocyanaselösung ausgesäet und die Hälfte aërob, die andere anaërob bei 37° C. aufbewahrt. Das Resultat der Zählung durch Aussaat abgemessener Mengen auf schief erstarrtes Zuckerserum war folgendes:

1. Versuch.

D a t u m	A ä r o b	A n a ä r o b
	1 <sup>cem</sup> Pyocyanaselösung enthält Diphtheriebacillen	1 <sup>cem</sup> Pyocyanaselösung enthält Diphtheriebacillen
25. Juli sofort nach Aussaat	2 600 000	2 600 000
28. Juli nach 72 Std. bei 37°C.	0	0

Mit einer Pyocyanaselösung, welche vermittelt einer anderen Varietät des Bac. pyocyaneus gewonnen war, wurde noch folgender Versuch ausgeführt.

2. Versuch.

D a t u m	A ä r o b	A n a ä r o b
	1 <sup>cem</sup> Pyocyanaselösung enthält Diphtheriebacillen	1 <sup>cem</sup> Pyocyanaselösung enthält Diphtheriebacillen
15. Juni sofort nach Aussaat	20 100 000	20 100 000
16. „ nach 24 Std. bei 37°C.	1 800 000	920 000
17. „ „ 48 „ „	nicht gezählt	105 417
18. „ „ 72 „ „	500	500
19. „ „ 96 „ „	0	0

Gegenwärtig verfügen wir, wie erwähnt, über eine viel wirksamere Pyocyanaselösung, deren bakteriolytischer Effect auch den Typhusbacillen gegenüber viel bedeutender sein wird, als er sich in den obigen Zahlen ausspricht.

Zum Beweise hierfür theilen wir mit, dass wir bei unserer ersten, schon vor Jahresfrist bereiteten Pyocyanaselösung keinen bakteriolytischen Effect bei allerdings sehr reichlicher Aussaat von Staphylococcus pyo-

genes aureus in dieselbe beobachteten. Mit der unter Anwendung geeigneterer Culturen und nach verbesserter Methode neuerdings von uns hergestellten Pyocyanelösung erzielten wir dagegen auch bei Staphylococcus pyogenes aureus so energische bakteriolytische Wirkungen, dass die Möglichkeit einer erfolgreichen Behandlung der zahlreichen, durch diesen Mikroorganismus verursachten Krankheiten, insbesondere auch der Pyämie, zugegeben werden muss.

Bei dem folgenden Versuche wurden unmittelbar vorher aus Panaritium-eiter gezüchtete Staphylokokken verwendet.

D a t u m	1 <sup>ccm</sup> Pyocyanelösung enthielt Staphylokokken
2. December sofort nach der Aussaat	23 250 000
3. „ nach 24 Stunden (bei 37° C.)	0

Die Wiederholung dieses Versuches ergab das gleiche Resultat.

D a t u m	1 <sup>ccm</sup> Pyocyanelösung enthielt Staphylokokken
5. December sofort nach der Aussaat	12 680 500
6. „ 24 Stunden nach der Aussaat	0

Ein dritter Versuch mit Staphylokokken und Pyocyaneus-Enzym hatte ebenfalls ein sehr günstiges Resultat.

D a t u m	1 <sup>ccm</sup> Pyocyanelösung enthielt Staphylokokken
6. December sofort nach der Aussaat	31 100 000
6. „ 6 Std. n. d. Aussaat (37° C.)	11 800 000
8. „ 36 „ „ „	0

Auch die Pestbacillen werden in kurzer Zeit von der Pyocyanease vernichtet und aufgelöst. Die betreffende Cultur war 2 Monate, bevor ich in den Besitz derselben gelangte, von Bombay nach Paris geschickt worden und als vollvirulent bezeichnet. Die Entwicklung auf Agar-Agar und in Bouillon war üppig und namentlich in letzterer charakteristisch. Eine kleine Menge 24 Stunden alter Agarcultur wurde direct in der Pyocyanelösung möglichst gut verrieben und zu folgenden Versuchen verwendet. Die Suspension der Pestbacillen in Pyocyanelösung wurde bei 37° C. gehalten.

D a t u m	1 <sup>cem</sup> Pyocyanaselösung enthielt Pestbacillen
25. October sofort nach der Aussaat	5 685 200
25. „ 5 Std. n. d. Aussaat bei 37° C.	0

Ein zweiter Zählversuch ergab ein noch günstigeres Resultat:

D a t u m	1 <sup>cem</sup> Pyocyanaselösung enthielt Pestbacillen
28. October sofort nach der Aussaat	27 120 000
28. „ 6 Stunden nach der Aussaat	0

Die Pestbacillen werden also ebenso rasch und in ebenso grosser Zahl durch die Pyocyanase aufgelöst, wie die Milzbrandbacillen. Es ist daher bestimmt zu erwarten, dass sich auch die Pestinfection bei Thieren durch Pyocyanaseinjectionen ebenso prompt und sicher coupiren lässt, wie dies bei der Milzbrandinfection der Fall ist. Wenn in Indien auszuführende Versuche dieses Resultat ergeben, so wird man die Pyocyanase auch als Heilmittel bei der menschlichen Pest versuchen müssen.

#### Schutzimpfung gegen Diphtherie vermittelt Pyocyanase-Immunproteïdin.

Wir konnten bis jetzt bei der Fülle anderer Arbeiten nur einige orientirende Versuche an Meerschweinchen über die Schutzwirkung von Pyocyanase-Immunproteïdin bei Diphtherie ausführen. 6 Meerschweinchen erhielten im Verlaufe von 8 Tagen 6 subcutane Injectionen von Pyocyanase-Immunproteïdin. Einen Tag nach der letzten Schutzimpfung wurden dieselben mit der 10- bis 20fach tödtlichen Dosis einer sehr virulenten Diphtheriebouilloncultur (von welcher 0.15<sup>cem</sup> bei subcutaner Injection in 36 Stunden tödtlich wirkten) durch subcutane Injectionen am Bauche inficirt.

Von diesen 6 Thieren blieben 2 am Leben. 3 der behandelten Thiere überlebten die beiden Controlthiere um mindestens 24 Stunden, ein Thier um 4 Tage. Weitere Versuche mit verbesserten und wirksameren Pyocyanasepräparaten müssen zeigen, ob das Pyocyanase-Immunproteïdin zur Heil- und Schutzimpfung bei der Diphtherie des Menschen empfehlenswerth erscheint oder nicht. Es wäre aber mit Rücksicht auf die Diphtheriebacillen lösende Wirkung der Pyocyanase jetzt schon angezeigt, zu versuchen, ob die Heilwirkung des Behring'schen Heilserums durch Bepinselung der diphtheritischen Schleimhaut mit Pyocyanaselösung oder durch Inhalation der letzteren unterstützt werden kann. Wir glauben

um so mehr, dass die Pyocyanase auch bei Diphtherie therapeutische Verwerthung finden wird, weil dieselbe, wie in einem späteren Capitel gezeigt wird, auch das Diphtherietoxin zersetzt, bezw. im thierischen Körper unwirksam macht.

### Heil- und Schutzimpfung mit Rothlauf-Enzym-Immunproteid in beim Rothlauf der Schweine.

Wir haben bereits in der Einleitung zu dieser Abhandlung erwähnt, dass auch die Schweine-Rothlaufbacillen in Flüssigkeitsculturen ein Enzym bilden, welches die Rothlaufbacillen aufzulösen im Stande ist.

Es ist in hohem Grade wahrscheinlich, dass es nach der Reindarstellung des Rothlaufbacillen-Enzyms möglich sein wird, den Rothlauf der Schweine durch Enzyminjectionen erfolgreich zu behandeln und eine wirksamere Schutzimpfung gegen diese verheerende Seuche auszubilden, als es die bisherige ist. Die folgenden Versuche wurden mit einem Rothlaufbacillen-Enzym-Immunproteid in ausgeführt, welches zu einer Zeit hergestellt wurde, in welcher die Methode der Gewinnung bakteriolytischer Enzyme noch wenig ausgebildet war. Nichtsdestoweniger lässt sich ein theilweiser Erfolg dieser neuen Schutzimpfungsmethode nicht verkennen. Ausserdem war die Menge der Rothlaufbacillen, welche den schutzgeimpften Thieren injicirt wurde, eine enorm grosse und die Virulenz der Bacillen war jedenfalls die höchst mögliche, da dieselben einen Tag vor Ausführung der Infection durch directe Uebertragung von Milzsaft eines an sehr acutem Rothlauf verendeten Schweines in Nährbouillon gezüchtet worden waren.

In der folgenden Tabelle sind die Mengen des behufs Schutzimpfung injicirten Rothlauf-Enzym-Immunproteids angegeben.

	13. Juli	14. Juli	15. Juli	16. Juli	17. Juli	18. Juli	Resultat der Infection
1. Kaninchen, graublau 2910 <sup>grm</sup>	7 ccm subcutan	5 ccm subcutan	5 ccm subcutan	8 ccm subcutan	7 ccm subcutan	8 ccm subcutan	† 31. Juli Nachts 10 <sup>a</sup>
2. Kaninchen, graublau 2930 <sup>grm</sup>	„	„	„	„	„	„	† 31. Juli Nachts 10-12 <sup>a</sup>
3. Kaninchen, graubraun 3108 <sup>grm</sup>	„	7 ccm subcutan	6 ccm subcutan	„	„	„	† 2. August Vorm. 10 <sup>a</sup>
4. Kaninchen, gelbbraun 2980 <sup>grm</sup>	5 ccm subcutan	4 ccm subcutan	5 ccm subcutan	„	„	„	bleibt leben
5. Kaninchen, braun 3085 <sup>grm</sup>	„	3 ccm subcutan	„	6 ccm subcutan	„	„	bleibt leben
6. Controlkan., 3538 <sup>grm</sup>							† 31. Juli Vorm. 9 <sup>b</sup>

Die 5 schutzgeimpften Kaninchen und das Controlkaninchen wurden am 28. Juni, Vormittags 11 Uhr, also 10 Tage nach der letzten Schutzimpfung, durch intravenöse Injection von je 1<sup>ccm</sup> 24 Stunden bei 36° C. gezüchteter Bouilloncultur inficirt.

Dieselben hatten am nächsten Tage sämmtlich hohes Fieber (40.6 bis 41.9° C.).

Das Controlthier starb nach 70 Stunden, das schutzgeimpfte Kaninchen Nr. 1 nach 83, das Kaninchen Nr. 2 nach ca. 85 Stunden, während das Kaninchen Nr. 3 erst am 5. Tage nach der Infection verendete und Kaninchen Nr. 4 und Nr. 5 noch heute (29. September) am Leben sind.

## VI. Bakteriolytische Wirkung der Immunsera in vitro.

Gegenwärtig herrscht allgemein die Ansicht, dass die Immunsera unfähig seien, die zugehörigen Bakterien in vitro zu tödten. Und man nahm deshalb Zuflucht zu den gezwungensten Annahmen, die immunisirende Wirkung im Thiere zu erklären. So soll nach Buttersack<sup>1</sup> „die erworbene Immunität als eine Art von Uebung der einzelnen Zellgattungen und des Auslösungsapparates“ aufzufassen sein. In ähnlicher Weise spricht sich Dollar<sup>2</sup> aus. Wassermann<sup>3</sup> äussert sich wie folgt: „Wir sehen also, dass die experimentell bewiesene Ansicht von der Abspaltung der baktericid wirkenden Stoffe aus dem Immuneserum durch Vermittelung des lebenden Organismus auch heute noch unwiderlegt ist.“ Ferner meint er: „Das Pyocyaneus-Immuneserum wirkt im Reagensglase durchaus nicht stärker abtödtend auf die Pyocyaneusbacillen, wie das Serum normaler Thiere.“<sup>4</sup>

Es kann wohl kein Zweifel mehr herrschen, dass auch R. Pfeiffer's den bekannten Thatsachen in geistreicher Weise Rechnung tragende Ansicht, dass mit der Uebertragung von Immuneserum lediglich Substanzen dem Thierkörper einverleibt werden, welche „durch eine Umstimmung denselben befähigen, sich der eingedrungenen Mikroben zu entledigen“,<sup>5</sup> nicht mit den im Folgenden mitgetheilten Versuchsergebnissen in Uebereinstimmung gebracht werden kann. Es wird vielmehr in der That eine stark baktericide, bakteriolytische Substanz mit dem Immuneserum direct übertragen. Der Grund aber, warum im Thiere diese Substanz schein-

<sup>1</sup> Virchow's *Archiv*. 1895. Bd. CXLII. S. 248.

<sup>2</sup> *Veterinarian*. T. LXVIII. p. 83.

<sup>3</sup> *Diese Zeitschrift*. Bd. XXII. S. 306 u. 307.

<sup>4</sup> Wassermann befindet sich hier im Widerspruch zu Roger.

<sup>5</sup> *Deutsche med. Wochenschrift*. 1896.

bar weit mehr Effect äussert als in vitro, ist offenbar in erster Linie der, dass die bisherigen Versuche in vitro bei vollem Luftzutritt ausgeführt wurden, der Sauerstoff im Blute aber, zwar nur locker, jedoch immerhin an das Hämoglobin gebunden und den Bakterien (besonders noch im subcutanen Bindegewebe) weit weniger zugänglich ist, als der freie moleculare Sauerstoff der Luft, mittels dessen die Bakterien bis zu einem gewissen Grade das eindringende Gift zerstören können. Noch weniger Sauerstoff steht den Bakterien im subcutanen Gewebe u. s. w. zur Verfügung. Viel kommt hier auch auf die relative Concentration der baktericiden Substanz an. Unsere Versuche ergaben, wie aus dem Folgenden ersichtlich, dass die baktericide Wirkung des Cholera- und Typhus-Immunserums anaërob auch in vitro stets und leicht eintritt. — Ein anderer Umstand aber, der im Thiere günstig wirkt, ist die stetige Bewegung des Blutes, die Bacillen kommen so in immer erneuertem Contact mit frischer baktericider Substanz und müssen so eher erliegen, als wenn sie ruhig am Boden eines Glasgefässes liegen und einander theilweise sogar durch Klümpchenbildung (Agglutination) gegen den Zutritt der Flüssigkeit schützen können.

### 1. Versuche über die Cholera-bacillen lösende Wirkung von Meerschweinchen-Immunserum bei aërober und anaërober Behandlung.

Versuch 1. Ein nahezu erwachsenes Meerschweinchen (Nr. 1) erhält am 27. Juni 0.3<sup>ccm</sup> Cholera-bacillen-Bouilloncultur (aus Thorgau stammend) subcutan.<sup>1</sup> Am 28. Juni 5<sup>ccm</sup> derselben Cultur (24 Stunden alt) subcutan. Am 2. Juli erhält das Thier 2<sup>ccm</sup> einer 3 Tage bei 24° C. gewachsenen Cholera-bacillen-Bouilloncultur mit 1 Oese Agarcultur subcutan. Am 11. Juli von eben solcher Cultur, in der aber noch 6 grosse Oesen Agarcultur verrieben wurden, 5<sup>ccm</sup> subcutan. Am 16. Juli 3½<sup>ccm</sup> einer 24 Stunden bei 37° C. gewachsenen, 10<sup>ccm</sup> betragenden Cholera-bacillen-Bouilloncultur, in welche aber noch zwei ganze Agarculturen (schief erstarrt mit grosser Oberfläche) verrieben worden waren, subcutan.

Am 19. Juli wurde das Meerschweinchen unter allen Vorsichtsmaassregeln (Rasiren der Haut am Halse, Sublimat-Alkoholwaschung und gründliches Abspülen mit sterilisirtem Wasser, Abtrocknen mit sterilisirter Watte u. s. w.) verbluten gelassen und nach dem Absetzen des Serums (in Eis) am 20. Juli in 4<sup>ccm</sup> des Serums eine kleine Menge einer 48 Stunden bei 25° C. gewachsenen Agarcultur von Cholera-bacillen (Thorgau) gut verrieben und vermischt. Nun wurden sofort 1 und 6 Oesen dieser Serum-bacillen-Suspension in Gelatine und Petrischalen ausgesät und alsdann diese

<sup>1</sup> 0.2<sup>ccm</sup> dieser Cultur genügten, um ein gleich grosses Meerschweinchen bei intraperitonealer Injection zu tödten.

Serummenge in zwei genau gleiche Hälften geteilt, von denen die eine bei Luftzutritt, die andere in Wasserstoffatmosphäre, wie oben auf S. 11 beschrieben, bei 37° C. aufbewahrt wurden. Nach 24 Stunden wurden wiederum mit 1 und 6 Oesen (geaichte Oesen) Zählgelatineplatten gegossen. Das Resultat war folgendes:

a) Aërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>cem</sup> Serum
20. Juli sofort nach der Aussaat . . .	29 520 000
21. „ nach 24stünd. Stehen bei 37° C.	0

b) Anaërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>cem</sup> Serum
20. Juli sofort nach der Aussaat . . .	29 520 000
21. „ nach 24stünd. Stehen bei 37° C.	0

Versuch 2. Ein ganz ebenso und zur gleichen Zeit wie das vorige gegen Cholera bacillen immunisirtes, nahezu erwachsenes, 502<sup>gramm</sup> schweres Meerschweinchen (Nr. 2) wurde am 21. Juli verbluten gelassen. Am 23. Juli wurde der folgende Versuch genau so wie der vorausgehend beschriebene zur quantitativen Beurtheilung der Cholera bacillen lösenden Wirkung des Immunserums unter aëroben und anaëroben Bedingungen ausgeführt.

a) Aërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>cem</sup> Serum
23. Juli sofort nach der Aussaat . . .	3 864 000
24. „ nach 24stünd. Stehen bei 37° C.	0

b) Anaërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>cem</sup> Serum
23. Juli sofort nach der Aussaat . . .	3 864 000
24. „ nach 24stünd. Stehen bei 37° C.	0

Es braucht wohl nicht bemerkt zu werden, dass in diesen beiden Versuchen die Erscheinungen der Agglutination in bekannter Weise zu beobachten waren.

Da nun bekanntlich die Immunsera bei Typhus und Cholera auch bei der Verdünnung mit Bouillon im Verhältnisse von 1:20, 1:40 u. s. w. noch sehr schöne Agglutination zeigen, so suchten wir zu entscheiden, ob auch unter diesen Bedingungen, bei welchen den Bacillen reichliche Mengen geeigneten Nährmaterials zur Verfügung stehen, nicht nur

Agglutination, sondern völlige Vernichtung und Auflösung einer grösseren oder geringeren Anzahl der ausgesäten Bakterien eintritt. Dies musste eintreten, wenn, unserer Ansicht entsprechend, die Agglutination und die künstliche Immunität auf der Wirkung eines Enzyms beruht. Da hierbei selbstverständlich quantitative Beziehungen zwischen der Menge des vorhandenen Enzyms und der agglutinirenden und Bakterien lösenden Wirkung desselben, sowie der Zahl der Bakterien vorausgesetzt werden müssen, so haben wir auch bei diesen Versuchen Bakterienzählungen in genau bestimmten Zeitabschnitten ausgeführt.

Cholera-Immunserum vom Meerschweinchen Nr. 1 wurde im Verhältnisse von 1 : 20 mit Bouillon vermischt, eine kleine Menge 24 Stunden bei 37° C. gewachsener Agarcultur von Cholera bacillen (aus Thorgau) darin verrieben und die aus 4<sup>ccm</sup> bestehende Probe in zwei genau gleiche Hälften getheilt, von denen die eine in der beschriebenen Weise in Wassertoffatmosphäre, die andere unter Watteverschluss im Reagensglase bei 37° C. aufbewahrt wurde.

Das Zählresultat war folgendes:

Immunserum + Bouillon 1:20. 1. Aërobe Aufbewahrung.

D a t u m	1 <sup>ccm</sup> Immunserum + Bouillon 1:20 enthält Cholera bacillen
20. Juli sofort nach Aussaat d. Cholera bac.	3 060 000
21. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	60 384 000

Immunserum + Bouillon 1:20. 2. Anaërobe Aufbewahrung.

D a t u m	1 <sup>ccm</sup> Immunserum + Bouillon 1:20 enthält Cholera bacillen
20. Juli sofort nach Aussaat d. Cholera bac.	3 060 000
21. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	4 145 000 <sup>1</sup>

Auch das Immunserum von dem in gleicher Weise wie das vorige, gegen Cholera immunisirten Meerschweinchen (Nr. 2) wurde mit Bouillon 1 : 20 vermischt und, wie soeben beschrieben, weiter verfahren.

Das Zählresultat war:

Cholera-Immunserum + Bouillon 1:20. 1. Aërobe Aufbewahrung.

D a t u m	1 <sup>ccm</sup> Immunserum + Bouillon 1:20 enthält Cholera bacillen
23. Juli sofort nach Aussaat d. Cholera bac.	17 002 000
24. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	unzählig! <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bei dieser Probe war der Stöpsel undicht geworden, so dass in den letzten Stunden des Versuches Luft Zutreten konnte.

<sup>2</sup> Starke Trübung der Bouillon u. Bildung einer dicken Haut auf der Oberfläche.

Cholera-Immuneserum + Bouillon 1:20. 2. Anaërobe Aufbewahrung.

D a t u m	1 <sup>ccm</sup> Immuneserum + Bouillon 1:20 enthält Cholera bacillen
23. Juli sofort nach Aussaat d. Cholera bac.	17 002 000
24. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	1 440 000
25. „ „ 48 „ „	928 800
26. „ „ 72 „ „	421 300
28. „ „ 112 „ „	0 völlige Lösung

Ausser diesen wurden noch die folgenden Versuche in gleicher Weise ausgeführt.

Versuch 3. Meerschweinchen Nr. 3 wird immunisirt, indem demselben am 20. April 1<sup>ccm</sup> Bouillon mit 0.1<sup>mg</sup> Agarcultur von Cholera bacillen (aus Berlin) subcutan injicirt wurden.<sup>1</sup>

Am 1. Mai werden 2 Oesen	} Agarcultur subcutan injicirt
„ 8. „ „ 5 „	
„ 16. „ „ 10 „	
„ 25. „ „ 15 „	

und dazu noch 2<sup>ccm</sup> Bouilloncultur (2 Tage bei 37° C. gewachsen).

Am 1. Juni wird dann schliesslich noch eine ganze schiefer erstarrte Agarcultur intraperitoneal injicirt und das Thier am 6. Juni verbluten gelassen.

Mit dem im Eisschranke abgesetzten Serum werden folgende Versuche ausgeführt.

1. Cholera-Immuneserum unverdünnt.

a) Aërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>ccm</sup> Serum
8. Juni sofort nach Zusatz der Cholera bac.	12 900 000
9. „ nach 24 Stunden bei 37° C. . .	90 100 000

b) Anaërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>ccm</sup> Serum
8. Juni sofort nach Aussaat d. Cholera bac.	12 900 000
9. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	560 000
10. „ „ 48 „ „	0

<sup>1</sup> 0.02<sup>ccm</sup> einer solchen Agarcultur, peritoneal injicirt, tödten ein gleich grosses Meerschweinchen in etwa 30 Stunden. — Bei den Resultaten der vorausgehenden und folgenden Versuche muss berücksichtigt werden, dass nach R. Pfeiffer (*Centralblatt für Bakteriologie*, Abth. I, Bd. XIX, S. 593) virulente Culturen von Cholera bacillen durch die specifischen Choleraantikörper, d. h. das Cholera-Immuno-proteid in erheblicher Weise beeinflusst werden als avirulente. Das Resultat des bakteriolytischen Versuches mit Immuneserum wird also sehr verschieden sein, je nach dem Grade der Virulenz der verwendeten Cholera bacillen-Culturen.

Zur Controle wurde der vorige Versuch mit dem gleichen Serum wiederholt und folgendes Resultat erhalten:

Unverdünntes Cholera-Immunserum.

a) Aërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>cem</sup> Serum
9. Juni sofort nach Zusatz d. Cholera bac.	19 200 000
10. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	72 000 000

b) Anaërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>cem</sup> Serum
9. Juni sofort nach Zusatz d. Cholera bac.	19 200 000
11. „ nach 48 Stunden bei 37° C.	0

Eine Wiederholung des Versuches mit dem gleichen Serum ergab bei anaërober Aufbewahrung:

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen pro 1 <sup>cem</sup> Serum
10. Juni sofort nach Zusatz d. Cholera bac.	3 850 000
11. „ nach 24 Stunden . . . . .	0

Auch mit Immunserum unter Zusatz von leicht assimilirbarem Nährmaterial, d. h. mit Mischungen von Cholera-Immunserum des Meerschweinchens Nr. 3 und Bouillon im Verhältnisse 1:20 und 1:40, wurden noch folgende Versuche über die Auflösung der Cholera bacillen bei aërober und anaërober Aufbewahrung ausgeführt.

1. Mischung von Cholera-Immunserum des Meerschweinchens Nr. 3 mit Bouillon 1:20.

a) Aërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen in 1 <sup>cem</sup> Serum-Bouillon-Mischung
9. Juni sofort nach Aussaat d. Cholera bac.	19 320 000
10. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	87 040 000

b) Anaërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen in 1 <sup>cem</sup> Serum-Bouillon-Mischung
9. Juni sofort nach Aussaat d. Cholera bac.	19 320 000
10. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	8 160 000
11. „ „ 48 „ „	0

2. Mischung des Cholera-Immunserrums von Meerschweinchen Nr. 3 mit Nährbouillon 1 : 40.

Anaërobe Aufbewahrung.

D a t u m	Zahl der Cholerabacillen in 1 <sup>cem</sup> Serum-Bouillon-Mischung
7. Juni sofort nach Aussaat d. Cholerabac.	22 400 000
8. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	9 900 000
9. „ „ 48 „ „	0

Zunächst müssen wir auf einen scheinbaren Widerspruch bei den obigen beiden Versuchsreihen aufmerksam machen. Bei dem ersten und zweiten Versuche auf S. 37 über die Cholerabacillen lösende Wirkung der Cholerase des Immunserrums sieht man, dass die in das Immunserrum ausgesäten 29, bezw.  $3\frac{3}{4}$  Millionen Cholerabacillen auch aërob innerhalb 24 Stunden völlig vernichtet, d. h. aufgelöst wurden, während bei dem Versuche auf S. 39 und 40 die 12, bezw. 19 Millionen Cholerabacillen im unverdünnten Serum zwar bei anaërober Aufbewahrung innerhalb 48 Stunden ebenfalls aufgelöst wurden, bei aërober Aufbewahrung aber sofort eine bedeutende Vermehrung eintrat, so dass die Zahl der Bacillen innerhalb 24 Stunden auf 72, bezw. 87 Millionen angewachsen war.

Dieser scheinbare Widerspruch, welcher auch uns Anfangs auffallend war, erklärt sich sehr einfach aus dem Grade der Immunisirung und er zeigt, wie sehr bei der künstlichen Immunisirung, wie überhaupt bei jedem Naturvorgange die quantitativen Verhältnisse in Betracht gezogen werden müssen, eine Thatsache, welche namentlich bei früheren Untersuchungen über die künstliche Immunität von vielen Autoren nicht genügend berücksichtigt wurde und in welchem viele, den Fortschritt der Wissenschaft hindernde, unrichtige Behauptungen begründet sind.

Sieht man die Verhältnisse genauer an, so klären sich die Widersprüche sofort auf. Die Meerschweinchen Nr. 1 und 2 wurden in viel höherem Grade immunisirt, d. h. die Menge der injicirten Cholerabacillen war insgesamt eine wesentlich höhere, als beim Meerschweinchen Nr. 3. Ausserdem erhielten die Meerschweinchen Nr. 1 und 2 grosse Mengen von Bouillonculturen der Cholerabacillen subcutan, während das Meerschweinchen Nr. 3 hauptsächlich nur mit Agarculturen immunisirt worden war. In den ersteren ist aber wahrscheinlich viel mehr Cholerase vorhanden, als in den Agarculturen. Der höhere Grad der künstlichen Immunität beim Meerschweinchen Nr. 1 gegenüber dem vom Meerschweinchen Nr. 3 spricht sich auch sehr deutlich in dem Umstande aus, dass 1<sup>cem</sup> des Immunserrums vom Meerschweinchen Nr. 1 die hohe Zahl von  $29\frac{1}{2}$  Millionen Cholerabacillen in 24 Stunden vernichtete, während 12 Millionen Cholerabacillen

von 1<sup>cem</sup> des Immunserums vom Meerschweinchen Nr. 3 erst nach 48 Stunden völlig aufgelöst waren. Ausserdem kommt bei diesen Versuchen auch die Art der Vertheilung der Cholerabacillenculturen im Immunserum in Betracht. Je besser die Cultur im Immunserum verrieben wird, d. h. je mehr die Cholerabacillen vertheilt werden und um so weniger Häufchen oder Conglomerate von Bacillen vorhanden sind, um so rascher wird die Auflösung erfolgen. Diesem Umstande ist es wohl zuzuschreiben, dass in der Mischung von Immunserum mit Bouillon im Verhältnisse von 1:20 beim Meerschweinchen Nr. 1 die völlige Auflösung von 17 Millionen Cholerabacillen 112 Stunden beanspruchte, während bei der Immunserum-Bouillonmischung vom Meerschweinchen Nr. 3 sogar 22 Millionen Bacillen schon in 48 Stunden abgetödtet waren.

Sehr bemerkenswerth ist endlich, dass eine Verdünnung des Immunserums mit Nährbouillon im Verhältnisse von 1:20 und andererseits im Verhältnisse von 1:40 keine Unterschiede in Bezug auf die zur Auflösung der Bacillen nöthige Zeit erkennen lässt, wenn das Immunserum aus sehr hoch immunisirten Thieren gewonnen wird, so dass die Cholerase in sehr grosser Concentration vorhanden ist.

Während im unverdünnten Cholera-Immunserum oft eine vollständige Auflösung der selbst in Mengen von vielen Millionen pro 1<sup>cem</sup> eingebrachten Cholerabacillen auch unter aëroben Verhältnissen beobachtet wurde, tritt in den Verdünnungen des Immunserums mit Bouillon bei Luftzutritt stets Vermehrung ein.<sup>1</sup> Die Erklärung hierfür findet sich in den Schlussbetrachtungen dieser Abhandlung.

Das wichtigste Resultat der obigen Untersuchungen ist die Feststellung der Thatsache, dass bei vermindertem Sauerstoffzutritte oder unter anaëroben Verhältnissen, wie sie innerhalb des Organismus vielen Orts gegeben sind, die bakteriolytische Leistung des Cholerase-Immunproteins eine sehr bedeutende ist. Wenn man bedenkt, dass schon 1<sup>cem</sup> Cholera-Immunserum 29 Millionen Cholerabacillen innerhalb 24 Stunden zu vernichten vermag, so stellt sich die bakteriolytische Wirkung des Gesamtblutes als eine ganz enorme dar. Durch diese Ueberlegungen muss man zu der Ueberzeugung kommen, dass es durch weitere Ausbildung der Immunisirungsmethoden gelingen muss, den menschlichen und thierischen Organismus gegen jede nur denkbare Art der natürlichen Infection zu schützen. Die Bedingungen hierfür sind im Organismus

---

<sup>1</sup> R. Pfeiffer (*Centralblatt für Bakteriologie*, Abth. I, Bd. XIX, S. 593) fand, dass die Cholerabakterien, wenn sie in Bouillonverdünnungen des Choleraserums wachsen, die „specifischen Choleraantikörper“ zerstören. Nach unserer Anschauung sind diese „specifischen Choleraantikörper“ unser „Cholerase-Immunprotein“.

jedenfalls vorhanden, und es kommt nur noch darauf an, die Enzyme bestimmter pathogener Bakterien in möglichst reinem Zustande und auf unschädliche Weise in den Organismus einzuführen.

Man könnte nun denken, dass die Cholera bacillen auch in Nährbouillon und im normalen Serum nicht immunisirter Thiere bei Sauerstoffabschluss, bezw. in Wasserstoffatmosphäre eine ähnliche Verminderung ihrer Zahl erleiden werden, wie wir dies für das Cholera-Immunserum und für die Mischungen desselben mit Bouillon ermittelt haben.

Die Ausführung dieser unumgänglich nothwendigen Controlversuche zeigte jedoch, dass sowohl in der Nährbouillon, als auch im normalen Serum nicht immunisirter Meerschweinchen bei einigermaßen bedeutender Einsaat nicht nur keine Verminderung, sondern vielmehr eine sehr bedeutende Vermehrung sowohl unter aëroben als anaëroben Verhältnissen eintritt.

Das Resultat dieser Versuche war folgendes:

1. Nährbouillon mit Cholera bacillen beschickt und bei 37° C. in Wasserstoff aufbewahrt.

Anaërob:

D a t u m	Zahl der Cholera bacillen in 1 <sup>com</sup> Nährbouillon
26. Juli sofort nach Aussaat d. Cholera bac.	5 936 000
27. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	11 060 000
30. „ „ 90 „ „	40 215 000

Es erfolgte somit in der Nährbouillon auch bei vollkommenem Sauerstoffabschlusse eine fortschreitende Vermehrung der Cholera bacillen; wenn dieselbe auch, wie voraus zu sehen war, geringer ist, als bei anaëroben Wachsthume der Cholera bacillen in Bouillon.

2. Normales Serum vom Meerschweinchen (welches sich bei 24stündigem Stehen des Blutes in Eis abgesetzt hatte) mit Cholera bacillen (24stündige Agarcultur) vermischt.

D a t u m	a) Aërob	b) Anaërob
	1 <sup>com</sup> normales Serum enthält Cholera bacillen	1 <sup>com</sup> normales Serum enthält Cholera bacillen
28. Juli sofort nach der Aussaat der Cholera bacillen	16 852 000	16 852 000
29. Juli 24 Stunden nach der Aussaat bei 37° C.	112 219 000	66 089 000

Beide Serumproben, sowohl die aërobe als die anaërobe, waren nach 24 Stunden stark trüb und selbstverständlich nicht agglutinirt. Die aërobe Probe ist schmutzig braun, die anaërobe schmutzig roth gefärbt, während anaërobe, mit Cholera-Bacillen versetzte Proben von Immunserum nach 24 Stunden stets vollkommen klar und normal gefärbt erscheinen mit einem aus agglutinierten Bacillen bestehenden Bodensatz.

Die starke bakteriolytische Wirkung des Cholera-Immunserums ist also eine ganz besondere, dem Immunserum und nicht etwa auch dem normalen Serum zukommende Eigenschaft.

## 2. Versuche über die Typhusbacillen lösende Wirkung von thierischem und menschlichem Immunserum unter aëroben und anaëroben Verhältnissen.

Die gleichen Versuche, wie die obigen, wurden nun auch mit Typhusbacillen und Typhus-Immunserum, sowie unter anaëroben Verhältnissen mit Typhusbacillen und Nährbouillon ausgeführt. Das Immunserum wurde von einem Kaninchen gewonnen, welches in folgender Weise immunisirt worden war:

Datum der Schutzimpfung:	Menge der subcutan injicirten Typhusbacillencultur:	
20. Juni	0.3 ccm	24stünd. Bouilloncultur,
28. "	2 ccm	" " "
2. Juli	2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> ccm	" " mit 2 Oesen Agarcultur,
11. "	5 ccm	" " mit 5 Oesen Agarcultur,
16. "	5 ccm	24 Stunden bei 37° C. gewachsener Bouilloncultur, in welcher eine ganze Agarcultur (schief erstarrter Agar) verrieben worden war.

Dieses Kaninchen wurde am 23. Juli verblutet und am 24. Juli nach 24stündigem Stehen des Blutes in Eis das Serum zu den folgenden Versuchen genommen. Die zu den bakteriolytischen Versuchen benutzte Typhusbacillen-Bouilloncultur war dieselbe, welche auch zur Immunisirung des Kaninchens verwendet worden war.

## 1. Wirkung des unverdünnten Typhus-Immunserums auf Typhusbacillen.

D a t u m	a) Aërob	b) Anaërob
	Typhusbacillen in 1 ccm unverdünnt. Typhusserum	Typhusbacillen in 1 ccm unverdünnt. Typhusserum
24. Juli sofort nach Aussaat der Typhusbacillen	3 019 200	3 019 200
25. Juli nach 24 Stunden bei 37° C.	1 078 000	735 600

(Fortsetzung.)

D a t u m	a) Aërob	b) Anaërob
	Typhusbacillen in 1 <sup>o</sup> cm unverdünnt. Typhusserum	Typhusbacillen in 1 <sup>o</sup> cm unverdünnt. Typhusserum
26. Juli n. 48 Std. bei 37° C.	1 915 000	383 120
27. " " 72 " "	56 124 000	360 000
29. " " 110 " "	unzählig	114 900

In eine Probe des gleichen Typhus-Immunsersums wurde eine reichlichere Einsaat von Typhusbacillen gemacht und die bakteriolytische Wirkung bei aërober und anaërober Aufbewahrung in 37° C. festgestellt.

2. Wirkung des unverdünnten Typhus-Immunsersums auf eine grössere Einsaat von Typhusbacillen.

D a t u m	a) Aërob	b) Anaërob
	Typhusbacillen in 1 <sup>o</sup> cm unverdünnt. Typhusserum	Typhusbacillen in 1 <sup>o</sup> cm unverdünnt. Typhusserum
25. Juli sofort nach Aussaat der Typhusbacillen	8 428 600	8 428 600
27. Juli n. 72 Std. bei 37° C.	63 578 000	497 900
29. " " 110 " "	unzählig	191 500

Von dem zu den obigen Versuchen benutzten Typhus-Immunsersum wurden nun Verdünnungen mit Nährbouillon im Verhältnisse 1:20 hergestellt und die bakteriolytische Wirkung auf Typhusbacillen durch zwei Versuche festgestellt.

3. Mischung von Typhus-Immunsersum mit Bouillon 1:20.

D a t u m	a) Aërob	b) Anaërob
	Typhusbacillen in 1 <sup>o</sup> cm Typhusserum + Bouill. 1:20	Typhusbacillen in 1 <sup>o</sup> cm Typhusserum + Bouill. 1:20
25. Juli sofort nach Aussaat der Typhusbacillen	6 704 600	6 704 600
27. Juli n. 72 Std. bei 37° C.	383 000 000	114 900
29. " " 112 " "	unzählig	76 600

Nach 72 Stunden war die anaërobe Serum-Bouillonmischung völlig klar mit einem sehr geringen Bodensatze aus agglutinierten Typhusbacillen; die aërobe Probe dagegen war stark und völlig trüb und hatte einen starken Bodensatz.

## 4. Mischung von Typhus-Immuneserum mit Bouillon 1:20.

D a t u m	a) Aërob	b) Anaërob
	Typhusbacillen in 1 <sup>ccm</sup> Typhusserum + Bouill. 1:20	Typhusbacillen in 1 <sup>ccm</sup> Typhusserum + Bouill. 1:20
24. Juli sofort nach Aussaat der Typhusbacillen	10 120 000	10 120 000
25. Juli n. 24 Std. bei 37° C.	6 156 000	nicht gezählt
26. „ „ 48 „ „	10 957.232	421 432
27. „ „ 72. „ „	274 192 000	421 300
30. „ „ 132 „ „	unzählig	612 800

Diese Zahlen zeigen, dass auch das Immuneserum von gegen Typhus immunisirten Kaninchen reichliche Mengen von Typhase-Immunitätsprotein enthält, welches binnen 72 Stunden 8 Millionen Typhusbacillen auflöste. Je höher der Grad der künstlichen Immunität, d. h. je grösser der Gehalt des Serums an Typhase-Immunitätsprotein, um so stärker ist natürlich die bakteriolytische Wirkung, welche durch den Zusatz von leicht assimilierbarem Nährmaterial (Bouillon) zum Immuneserum nicht aufgehoben wird. Es ist im Gegentheil sehr auffallend, wie stark bakteriolytisch die kleine Menge Immuneserum in der Bouillonmischung wirkt; denn 1<sup>ccm</sup> Bouillonmischung enthielt bei den obigen Versuchen nur 0.05<sup>ccm</sup> Immuneserum.

Es war nun zur Controle noch festzustellen, ob in gewöhnlicher Nährbouillon bei anaëroben Verhältnissen, d. h. in Wasserstoffatmosphäre, eine Verminderung oder eine Vermehrung eingesäeter Typhusbacillen eintritt, falls die Einsaat so reichlich ist, wie in den obigen Versuchen.

Die Ausführung dieses Versuches ergab ein sehr sprechendes Resultat:

Typhusbacillen in Nährbouillon ausgesät und anaërob bei 37° C.  
aufbewahrt.

D a t u m	1 <sup>ccm</sup> Nährbouillon enthält Typhusbacillen
27. Juli sofort n. Aussaat der Typhusbac.	13 409 000
28. „ nach 24 Stunden bei 37° C.	271 930 000

24 Stunden nach der Einsaat der Typhusbacillen war diese anaërob aufbewahrte Bouillon durch die starke Vermehrung der Typhusbacillen völlig trüb und die Trübung nahm in den folgenden 24 Stunden so bedeutend zu, dass die Zählung, welche nicht mehr direct, sondern nur durch Verdünnung mit sterilisirtem Wasser u. s. w. ausführbar gewesen wäre, unterlassen werden konnte.

Die Zahl der Typhusbacillen, welche normales Serum von nicht immunisirten Kaninchen aërob und anaërob zu vernichten vermag, ist, wie der Versuch auf S. 49 zeigt, eine ungemein viel geringere, als jene, welche das Typhase-Immunproteid in Immunserum in bestimmter Zeit zur Abtödtung und Lösung bringt.

Auch das Serum von typhuskranken Menschen besitzt in der 3. Woche der Krankheit energische bakteriolytische Wirkungen; auch beim Typhuskranken bilden sich allmählich mehr oder weniger grosse Mengen von Typhase-Immunproteid, durch dessen Wirkung die Heilung zu Stande kommt. Der folgende Versuch zeigt die Grösse der bakteriolytischen Wirkung. Das Serum stammte von einem seit 3 Wochen an Typhus erkrankten Manne. Dasselbe war durch Aderlass schon am 30. Mai gewonnen und wurde bis zum Versuche in Eis aufbewahrt. In dasselbe wurden Typhusbacillen von einer 24 Stunden bei 37° C. gewachsenen Agarcultur eingesät.

1. Unverdünntes menschliches Typhusserum.

D a t u m	a) Aërob	b) Anaërob
	1 <sup>cem</sup> Typhusserum enthielt Typhusbacillen	1 <sup>cem</sup> Typhusserum enthielt Typhusbacillen
2. Juni sofort nach d. Aussaat.	166 400 000	166 400 000
3. „ nach 24 Std. bei 37° C.	29 120 000	16 810 000

Ebenso zeigte die Verdünnung des Serums mit Nährbouillon im Verhältnisse von 1:40, wie der folgende Versuch ergibt, sehr energische bakteriolytische Wirkungen. Auch in die Serum-Bouillonmischung wurden Typhusbacillen von einer 24 Stunden bei 37° C. gewachsenen Agarcultur eingesät.

2. Menschliches Typhusserum + Bouillon 1:40.

D a t u m	a) Aërob	b) Anaërob
	1 <sup>cem</sup> Typhusserum-Bouillon enthielt Typhusbacillen	1 <sup>cem</sup> Typhusserum-Bouillon enthielt Typhusbacillen
1. Juni sofort nach der Aussaat der Typhusbacillen	23 040 000	23 040 000
2. Juni nach 17 Std. b. 37° C.	9 400 000	4 890 000
3. „ „ 40 „ „	6 030 000	2 940 000
4. „ „ 5 Tagen „	2 880 000	nicht gezählt

1<sup>cem</sup> unverdünntes Serum von einem Typhuskranken in der 3. Woche vernichtete also innerhalb 24 Stunden die enorme Zahl von 137 Millionen Typhusbacillen und selbst 1<sup>cem</sup> des im Verhältnisse von 1:40 mit Bouillon

verdünnten Serums löste innerhalb 17 Stunden 18 Millionen Typhusbacillen auf.

Das ist eine ganz bedeutende Leistung. Diese Erkenntniss und die obigen, so sprechenden Zahlen geben uns zum ersten Male einen klaren Einblick in den Heilungsvorgang bei Infectionskrankheiten. Die Heilung wird um so früher und um so sicherer zu erwarten sein, je grösser die Menge des Typhase-Immunproteïdins im Blute und je grösser dementsprechend die bakteriolytische Wirkung des Blutserums bei Luftabschluss ist.

Hiermit hat der anaërobe bakteriolytische Versuch prognostischen Werth bekommen. Man wird in Zukunft das Blutserum von Typhuskranken auf dessen Typhusbacillen lösende Wirkung bei Luftabschluss quantitativ prüfen müssen, um auf Grund des Resultates die Prognose zu stellen. Die Prognose ist voraussichtlich um so günstiger, je früher die bakteriolytische Wirkung eine bestimmte Höhe erreicht. Es wäre zunächst angezeigt, durch eine grössere Reihe von klinisch bakteriolytischen Versuchen bei zahlreichen Typhuskranken in verschiedenen Stadien der Krankheit eine grössere Zahlenreihe zu ermitteln und diese dann mit dem beobachteten späteren Verlaufe der Krankheit zu vergleichen.

Aus dieser höchst verdienstvollen Arbeit müssen sich dann zahlenmässige Anhaltspunkte für eine sichere Prognose ergeben. Dass die Prüfung des Blutserums eines vermeintlichen Typhuskranken auf seine bakteriolytische Wirkung ein viel sichereres Mittel zur Sicherstellung der Diagnose ist, als die Agglutination, braucht kaum gesagt zu werden. An Stelle des bisher von den Aerzten ausgeführten Agglutinationsversuches muss in Zukunft der anaërobe bakteriolytische Versuch treten, da derselbe ein zahlenmässiges Resultat ergiebt und sowohl für die Diagnose als für die Prognose Ausschlag gebend und jedenfalls zuverlässiger ist, als der oft zu Täuschungen Veranlassung gebende Agglutinationsversuch.

### 3. Die bakteriolytische Wirkung normalen Blutes bei Sauerstoffabschluss.

Ueber die baktericide Wirkung normalen Blutes bei Sauerstoffabschluss haben wir bis jetzt nur wenige Versuche ausgeführt. Die Resultate waren negativ, d. h. es konnte ein Einfluss des Sauerstoffabschlusses auf die Grösse der Wirkung der bakteriolytischen Substanz des normalen Blutes nicht erwiesen werden.

Die folgenden beiden Versuche wurden mit frischem Kaninchen-Blutserum und 24 Stunden alten Agarculturen von *Bacterium coli commune* und Typhusbacillen ausgeführt.

Baktericide Wirkung normalen Kaninchen-Blutserums bei aërober und anaërober Aufbewahrung bei 37° C.

	Aërob			Anaërob		
	sofort nach Aussaat	nach 2 Stunden	nach 5 Stunden	sofort nach Aussaat	nach 2 Stunden	nach 5 Stunden
Bacterium coli commune	500 600	800 100	1 200 000	500 600	480 000	500 000
Bacillus typhi	52 000	1 000	400	52 000	800	250

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, dass die baktericide Wirkung des Kaninchen-Blutserums eine sehr geringe war, insofern 52 000 Typhusbacillen innerhalb 5 Stunden von 1 <sup>cem</sup> des Serums noch nicht vollkommen vernichtet waren. Wie enorm ist dem gegenüber die bakteriolytische Wirkung der Immunsera! Durch den Sauerstoffabschluss wurde die baktericide Wirkung des normalen Serums auf Typhusbacillen nicht erhöht.

Bei Bacterium coli trat bei Luftzutritt sogar Vermehrung ein, während bei Luftabschluss die Zahl der eingesäten Keime 5 Stunden hindurch die gleiche blieb. Dieses letztere Resultat ist jedoch nicht auf eine Erhöhung der baktericiden Wirkung, sondern lediglich auf den Sauerstoffabschluss zurückzuführen, der ja bei obligat und facultativ aëroben Bakterien die Vermehrung behindert.

Im Allgemeinen ergibt sich ein grosser Unterschied bei aërober Behandlung zwischen dem Pyocyaneus-Enzym und den Immunsera. Bei ersterem sehen wir, dass der bakteriolytische Effect aërob fast so energisch ist, wie bei anaërober Behandlung (bei Anthrax, Diphtherie, Staphylococcus pyogenes aureus, Pestbacillen u. s. w.). Dagegen können sich bei den Immunsera bei aërober Behandlung und starker Aussaat die Bakterien beträchtlich vermehren, während bei anaërober Behandlung ein sehr bedeutender bakteriolytischer Effect hervortritt. Manchem wird dies sehr mysteriös erscheinen; aber nach unserer Theorie lässt sich eine sehr einfache Erklärung hierfür geben.

Wir müssen dabei beachten, dass in beiden Fällen die Bakterien eine gewisse Menge Enzym durch oxydative Thätigkeit unwirksam machen können.

Im Immunserum ist nun das Enzym der betreffenden pathogenen Bakterien mit einem thierischen Eiweisskörper zu einem hochmolecularen Complex (immunisirender Stoff = Immunproteïdin) verbunden, welcher weit langsamer in die Membranen und das Protoplasma der Bakterien eindringen kann, als das ursprüngliche Bakterienferment an sich im freien Zustande. In beiden Fällen aber wird bei gleicher oxydativer Thätigkeit der Bakterien die Zerstörung des complexen Enzyms (Immunproteïdin)

im Immunserum grössere Fortschritte machen können, bevor eine genügende Menge in die specifisch pathogenen Bakterien selbst eindringen kann. Beim freien Enzym dagegen, welches wegen bedeutend kleineren Molecüls weit rascher in die Membran und das Protoplasma eindringen kann, gelingt es den Bakterien nicht, durch oxydative Thätigkeit in derselben Zeit genügend Enzym unschädlich zu machen.

Man kann sich die Sache am einfachsten so vorstellen, dass das freie Enzym z. B. in 10 Mal grösserer Menge in derselben Zeit in die Zellen eindringen kann, als das hochmoleculäre Enzym des Immunserums. Wenn nun in beiden Fällen die oxydative Thätigkeit der Bakterien die gleiche ist und z. B. genügt, um die nicht eingedrungene Menge des hochmolecularen Enzyms des Immunserums in vitro zu oxydiren, so wird lediglich ein entsprechender Theil des freien Enzyms ebenfalls der oxydativen Thätigkeit anheimfallen und es würden daher  $\frac{9}{10}$  des freien Enzyms ihre bakteriolytische Thätigkeit ausüben können.

## VII. Kann ein bakteriolytisches Enzym auch entgiftend auf die Toxine pathogener Bakterien wirken?

Diese Frage muss auf Grund unserer Untersuchungen ebenfalls mit ja beantwortet werden. Damit ist nun auch eine befriedigende Erklärung der Ursache, bezw. des Chemismus der künstlichen Immunität bei toxischen Infectionskrankheiten gegeben und ausserdem geht daraus hervor, dass die Ursache der Immunität bei toxischen und septicämischen Infectionskrankheiten im Wesentlichen die gleiche ist. Hier wie dort werden durch das Immunproteid, welches eine Verbindung des bakteriolytischen Enzyms der specifischen pathogenen Bakterien mit Blut- oder Organeiwiss darstellt, nicht nur die betreffenden pathogenen Bakterien gelöst, sondern auch deren Gifte, welche wahrscheinlich ebenfalls enzymartiger Natur sind, zerstört. Bei der Immunität gegen toxische Infectionskrankheiten ist die letztere (giftzerstörende), bei derjenigen gegen septicämische Infectionskrankheiten die erstere (bakteriolytische) Wirkung vorherrschend und von grösserer Bedeutung.

### Entgiftung des Diphtherietoxins durch Pyocyaneus-Enzym.

Versuch 1. Am 15. November 1898 werden 0.1<sup>ccm</sup> im Vacuum concentrirter, durch Berkefeldfilter filtrirter Diphtheriecultar mit 0.9<sup>ccm</sup> destillirten und sterilisirten Wassers vermischt und unter Watte- und Gummikappenverschluss bei 37° C. aufbewahrt.

In ganz gleicher Weise wurden 0.1<sup>ccm</sup> derselben concentrirten und filtrirten Diphtheriecultar mit 0.9<sup>ccm</sup> einer aus gefälltem und getrocknetem

Pyocyanus-Enzym durch sterilisirtes Wasser hergestellten Lösung vermischt und in den auf 37° C. eingestellten Brutschrank gebracht.

Am 16. November, d. h. nach 18stündigem Stehen bei 37° C., erhält ein 336 gr<sup>m</sup> schweres Control-Meerschweinchen von der ersterwähnten Lösung des Diphtherietoxins in Wasser 0.3 c<sup>cm</sup>, und ein 334 gr<sup>m</sup> schweres, rothgezeichnetes Meerschweinchen ebenfalls 0.3 c<sup>cm</sup> der obigen Mischung von Diphtheriecultur und Pyocyanaselösung subcutan am Bauche. — In diesen 0.3 c<sup>cm</sup> waren also in beiden Fällen 0.03 c<sup>cm</sup> der concentrirten Diphtherietoxinlösung enthalten.

Am 17. November, Vormittags, d. h. 18 Stunden nach der Injection, wird das Controlthier, welches lediglich die verdünnte Diphtherietoxinlösung erhalten hatte, todt aufgefunden.

Das rothgezeichnete Meerschweinchen, welchem von der Mischung des Diphtherietoxins mit Pyocyanaselösung injicirt worden war, ist am Leben.

Am 19. November, Abends, stirbt auch das rothgezeichnete Meerschweinchen, welches eine einmalige Pyocyanaseinjection erhalten hatte.

Dieser Versuch zeigte, dass die bei demselben injicirte Giftdosis ausserordentlich hoch ist, da das Controlthier schon nach 18 Stunden verendete. Trotzdem war eine entgiftende Wirkung der Pyocyanase nicht zu verkennen, da das damit behandelte Meerschweinchen 2 $\frac{1}{2}$  Tage länger lebte, als das Controlthier. Es war somit zu erwarten, dass durch Herabsetzung der Giftdosis und Wiederholung der Enzyminjection wesentlich günstigere Resultate zu erzielen seien.

Versuch 2. Bei einem zweiten Versuche wurde die Giftdosis auf  $\frac{1}{3}$  der beim vorigen Versuche erwähnten herabgesetzt und das eine Meerschweinchen erhielt ausserdem an 3 auf einander folgenden Tagen Injectionen von je 0.8 c<sup>cm</sup> Pyocyanaselösung in das subcutane Gewebe des Bauches, in welches auch das Diphtherietoxin injicirt worden war. Das Controlthier starb schon 30 Stunden nach der Giftinjection, während das mit Pyocyanase behandelte Meerschweinchen erst am Abend des 3. Tages nach der Gifteinspritzung an einer secundären Infection (durch Bakterien verursacht) zu Grunde ging.

Bei demselben ergab die Section einen höchst merkwürdigen Befund.

Die Epidermis war in einmarkstückgrosser Ausdehnung an der Injectionsstelle der Pyocyanase am Bauche aufgelöst, die darunter liegende Haut war wie macerirt. Während bei dem Controlthiere, welches nur eine subcutane Injection von Diphtherietoxin in die Bauchhaut erhalten hatte, eine über den ganzen Bauch und einen Theil der Brust ausgedehnte sulzige Infiltration des subcutanen Gewebes (Diphtherieödem), ähnlich dem Milzbrandödem, zu constatiren war, fand sich bei dem mit Pyocyanase behandelten Meerschweinchen keine Spur eines solchen Oedems; dagegen war die Haut, offenbar in Folge partieller Lösung des subcutanen Gewebes durch die Pyocyanase, in der Umgebung der Injectionsstelle am Bauche von der darunter liegenden Fascie abgelöst und in der Peripherie dieser Stelle vertrocknet. Von der von Epidermis entblösten Hautstelle aus waren offenbar pathogene Bakterien eingewandert, welche den Tod des Thieres verursachten.

Aus diesem Versuche war demnach zu ersehen, dass bei wiederholter Pyocyaneinjection in das subcutane Gewebe eine partielle Auflösung desselben und sogar eine Maceration und Auflösung der Epidermis durch das Pyocyaneus-Enzym beim Meerschweinchen, welches bekanntlich für die Pyocyaneusinfection sehr disponirt ist, eintreten kann. Die in Folge hiervon entstehenden kleinen Hautulcerationen heilen übrigens sehr rasch, wenn man dieselben mit Jodoform bestreut und mit Collodium deckt. Bei Kaninchen wurden ähnliche Erscheinungen bisher nicht beobachtet.

Aus diesem Versuche ergab sich also die interessante Thatsache, dass das Pyocyanasen-Enzym sogar das lebendige Gewebe der Meerschweinchenhaut aufzulösen im Stande ist.

Man darf deshalb niemals in ein und dieselbe Hautstelle wiederholte Injectionen von Pyocyanase machen. Wir zogen es vielmehr, mit Rücksicht auf dieses Vorkommniss, vor, die Pyocyanase bei Heilversuchen in die Musculatur, anstatt in das subcutane Gewebe zu injiciren.

Versuch 3. Am 17. December 1898 erhielten ein Meerschweinchen (a) von 408 <sup>grm</sup> Körpergewicht und ein 414 <sup>grm</sup> schweres Meerschweinchen (b) je 0.003 <sup>ccm</sup> der durch Berkefeldfilter filtrirten und im Vacuum concentrirten, nachgewiesener Maassen bacillenfreien Diphtherie-Bouilloncultur subcutan am Bauche. Die Giftdosis war also 10 Mal geringer, als beim ersten Versuche. Dem Meerschweinchen a werden  $\frac{1}{4}$  Stunde später 1.0 <sup>ccm</sup> in sterilisirtem Wasser gelöster Pyocyanase in das subcutane Gewebe am Bauche injicirt. Am 18. December werden 0.8 <sup>ccm</sup> der gleichen Pyocyanaselösung in die Musculatur des rechten Hinterschenkels und am 19. December 0.5 <sup>ccm</sup> derselben in die Muskeln des linken Vorderschenkels injicirt. Am Abend des 19. December verendete das Controlmeerschweinchen b. Bei der Section findet sich ein über den Bauch und einen Theil der Brust ausgedehntes Oedem (sulzige Infiltration des subcutanen Gewebes), welches auch schon Tags zuvor deutlich fühlbar war, sowie die übrigen, bekannten Erscheinungen der Diphtherieintoxication (Vergrößerung und Dunkelrothfärbung der Nebennieren u. s. w.). Bei dem mit Pyocyanase behandelten Meerschweinchen a ist keine Spur einer solchen Infiltration zu bemerken; dagegen ist eine linsengrosse Stelle der Bauchhaut (Injectionstelle der Pyocyanase) von Epithel entblösst und die Haut lässt sich leicht von der Musculatur an der betreffenden Stelle abheben. Um eine Infection von dieser Stelle aus zu verhüten, wird dieselbe mit Jodoformcollodium überstrichen. Das Thier scheint im Uebrigen gesund zu sein, es ist lebhaft und frisst Brot und Grünfutter.

Versuch 4. Zwei Meerschweinchen, dass eine (c) von 427 <sup>grm</sup> Gewicht und das andere (d), welches 415 <sup>grm</sup> schwer war, erhielten am 20. December je 0.004 <sup>ccm</sup> Diphtherietoxinlösung subcutan am Bauche. Dem schwächeren Meerschweinchen (d) wurden gleich darauf 1.0 <sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung unter die Haut der anderen Bauchseite injicirt. Am 21., 22. und 23. December wurden diesem Thiere je 0.5 <sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung in die Musculatur des Hinterschenkels und einer vorderen Extremität injicirt. Am 23. December erschien die Haut an einer bohngrossen Stelle des Hinterschenkels dunkel-

roth, wie wenn ein Bluterguss unter dieselbe stattgefunden hätte. Am 24. fehlte das Epithel an dieser Stelle, weshalb dieselbe mit Jodoform bestreut und mit Collodium bestrichen wurde. Das Controlmeerschweinchen (c) verwendete in der Nacht vom 22. auf 23. December. An der Injectionsstelle fand sich die sulzige Infiltration des subcutanen Gewebes und ebenso waren die Veränderungen der Nebennieren sehr charakteristisch ausgebildet. Das mit Pyocyanaselösung behandelte Meerschweinchen magerte ziemlich stark ab und frass in den ersten Tagen nach der Injection sehr wenig. Vom 25. December ab war das Thier wieder sehr lebhaft, es frass viel, und heute (1. Januar 1899) wiegt dasselbe wieder 412 <sup>grm</sup>.

Dieser Versuch wurde genau in der gleichen Weise an 5 Meerschweinchen von 431, 425, 423, 417 und 412 <sup>grm</sup> Körpergewicht wiederholt. Das 441 <sup>grm</sup> schwere Controlmeerschweinchen starb am 3. Tage nach der Injection des Diphtheriegiftes. Von den 5 anderen Meerschweinchen starb eines, welches nur zwei subcutane Pyocyanasenjectionen erhalten hatte, 2 $\frac{1}{2}$  Tage nach dem Tode des Controlthieres. Die anderen 4 Thiere, welche drei, bezw. vier subcutane Injections von 0.5 bis 1.0 <sup>cem</sup> Pyocyanaselösung erhalten hatten, leben noch heute. Auch die Infiltration des subcutanen Gewebes an der Injectionsstelle kam in Folge der Pyocyanasenjection nicht zur Entwicklung.

Da die Pyocyanasen nicht nur grosse Mengen von Diphtheriebacillen in vitro und im thierischen Körper aufzulösen im Stande ist, sondern auch das Diphtheriegift im Organismus zu zersetzen, bezw. unwirksam zu machen und somit sowohl die Diphtheriebacillen-Infektion, als auch die Diphtherietoxin-Intoxication zu coupiren vermag, so ist es gewiss nicht unbescheiden, wenn wir den Wunsch aussprechen, dass die Kliniker bei der Behandlung der Diphtherie die Pyocyanasen, wenn auch nicht anstatt, so doch neben dem Heilserum versuchen möchten.

### VIII. Eigenschaften der Pyocyanasen.

Hr. Dr. Gustav Graff hatte die Güte, eingehendere Untersuchungen über die Eigenschaften der Pyocyanasen anzustellen. Von den erzielten Resultaten theilen wir einstweilen die folgenden mit.

Die aus den Culturflüssigkeiten gefällte Pyocyanasen stellt eine hellgelbgrünliche bis olivgrünliche, leichte, bröcklige und amorphe Masse dar. Dieselbe löst sich in destillirtem Wasser sehr leicht, und zwar bei durchfallendem Lichte, je nach der Concentration mit brauner (starke Concentration), gelber (mittlere Concentration) oder grünlichgelber Farbe (starke Verdünnung), wie letztere gewissen Culturen des Bacillus pyocyaneus eigen ist. Bei auffallendem Lichte zeigt die Lösung (auch die tiefbraune) grüne Fluorescenz. Die Reaction der Lösung ist deutlich alkalisch.

Ferrocyanwasserstoffsäure ruft in der Lösung keine Fällung hervor. Auch Millon's Reagens oder die Biuretreaction geben keine Violettfärbung. Dagegen tritt beim Kochen geringer Mengen der Substanz mit rauchender Salzsäure eine sehr deutliche Violettfärbung auf, die bei etwas grösserer Substanzmenge von einer dunklen Malagafarbe abgelöst wird, welche letztere aber noch deutlich eine violette Farbnuance erkennen lässt.

Wird die Substanz mit Kalilauge schwach erwärmt, so tritt intensive Gelbfärbung ein und auf Zusatz von Bleiacetatlösung entsteht allmählich ein geringer schwarzer Bodensatz, so dass die Substanz geringe Mengen Schwefel zu enthalten scheint. In schwach alkalischer Lösung mit Wasserstoffsperoxydlösung versetzt, entwickelt die Pyocyanase entweder so stürmisch Sauerstoff, dass fast der ganze Inhalt des Reagensglases herausgeschleudert wird, oder aber die Entwicklung von Sauerstoff geht weniger plötzlich, aber immer sehr lebhaft von statten und hält Stunden lang an. Diese Eigenschaft behält die Pyocyanase unverändert bei, auch wenn sie längere Zeit (5 Tage) unter Alkohol aufbewahrt wird; ebenso zeigte sie dieselbe noch nach 24stündigem Stehen unter Chloroform.

Höchst merkwürdig ist das Verhalten der Pyocyanase gegen hohe Temperaturen. 2<sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung wurden 1½ Stunden auf 85 bis 90° C. erhitzt, mit 2 619 744 Milzbrandbacillen (24stündige Agarcultur bei 37° C. gewachsen) versetzt und nach wenigen Minuten Gelatineplatten mit je 3 und 1 Oese dieser Mischung hergestellt und bei 24° C. aufbewahrt. Zwei schiefe erstarrte Agarproben wurden mit je 1 und 5 Oesen der Mischung derart bestrichen, dass die Oberfläche des Nährbodens an vielen Stellen mit dem Platindraht geritzt wurde, um etwa noch lebensfähige Milzbrandbacillen in tiefere Schichten des Agars zu bringen und dieselben so der Wirkung der mitübertragenen minimalen Mengen von Enzym zu entziehen. Alle diese Gelatineplatten und Agarproben blieben wider Erwarten steril. Selbstverständlich war das Gleiche der Fall bei ebenso viel Gelatineplatten und Agarproben, welche 2, 7 und 24 Stunden nach Zumischung der Milzbrandbacillen durch Aussaat gleicher Mengen der Pyocyanase-Milzbrandbacillen-Suspension hergestellt worden waren.

Ein gleiches Resultat hatten zwei Versuche, bei welchen eine ebenso grosse Zahl von Milzbrandbacillen in 2<sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung gebracht wurde, nachdem dieselbe, im Reagensglase befindlich, 1½ Stunden (bei 721<sup>mm</sup> Barometerstand, also bei einer Temperatur von 98·5° C.) im kochenden Wasser gestanden hatte.

Die Zahl der in die Pyocyanaselösung ausgesäten Milzbrandbacillen wurde so ermittelt, dass von derselben Milzbrandbacillen-Aufschwemmung in Wasser, von welcher 6 Oesen in 2<sup>ccm</sup> Pyocyanaselösung übertragen

worden waren, in analoger Weise auch 6 Oesen in 2<sup>cem</sup> sterilisirtes Wasser gebracht wurden, aus welchem dann je 1 und 3 Oesen auf Gelatineplatten (Petrischalen) ausgesät wurde. Da nach Ficker<sup>1</sup> in destillirtem Wasser eine grosse Zahl älterer Bakterienzellen rasch ihre Entwicklungsfähigkeit verlieren, so sind die angegebenen Zahlen der in der Pyocyanelösung momentan abgetödteten Milzbrandbacillen eher zu gering, als zu hoch angegeben.

2 619 744 vollvirulenter Milzbrandbacillen waren also fast momentan, oder höchstens in 5 Minuten durch 2<sup>cem</sup> Pyocyanelösung völlig vernichtet worden. Wahrlich eine ganz enorme Zahl und eine ganz gewaltige Leistung!

Sogar die einstündige Einwirkung des strömenden Dampfes (von 98.5° C. bei 721<sup>mm</sup> Barometerstand) war nicht im Stande, die bakteriolytische Wirkung der Pyocyanase aufzuheben. Es war nur eine Verminderung der bakteriolytischen Eigenschaften zu constatiren; auch die anderen wesentlichen Eigenschaften der Pyocyanase, wie z. B. die Sauerstoffentwicklung bei Zusatz von schwach alkalisch gemachter Wasserstoffsuperoxydlösung, blieben erhalten. Die Sauerstoffentwicklung war allerdings weniger stark, als bei nicht erhitzten, gleich grossen Pyocyanaseproben.

Trotz der Widerstandsfähigkeit der Pyocyanase gegen hohe Temperaturen müssen wir dieselbe dennoch als eine enzymartige Substanz bezeichnen, weil die räthselhafte und so energische Wirkung der minimalsten Mengen dieses Stoffes nur bei dieser Annahme erklärbar erscheint.

Analoge Beobachtungen wurden übrigens auch bei anderen eiweisslösenden, sogenannten peptonisirenden Fermenten, z. B. von Wurtz<sup>2</sup> beim Papaïn (Papayotin) gemacht. Wurtz constatirte, dass nach dem Erhitzen auf 105° die peptonisirende Wirkung des Papayotins vollkommen erhalten war.

Die grosse Widerstandsfähigkeit der Pyocyanase gegen hohe Temperaturen erscheint weniger merkwürdig, wenn man die, allerdings erst ganz kürzlich, von uns constatirte Thatsache beachtet, dass auch der *Bacillus pyocyaneus*  $\frac{3}{4}$ stündiges Erhitzen im kochenden Wasserbade und  $1\frac{1}{4}$ stündiges Erhitzen auf 85 bis 90° C. aushält, ohne seine Entwicklungsfähigkeit zu verlieren, oder auch nur Einbusse daran zu erleiden. Eine durch Berkefeldfilter filtrirte, im Vacuum auf  $\frac{1}{10}$  concentrirte Cultur des *Bacillus pyocyaneus* wurde  $\frac{3}{4}$  Stunde im kochenden Wasserbade und eine andere

<sup>1</sup> Martin Ficker, Ueber Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen. *Diese Zeitschrift*. 1899. Bd. XXIX.

<sup>2</sup> *Compt. rend.* 1890, p. 1379, und 1891, p. 787.

Probe der gleichen Flüssigkeit  $1\frac{1}{4}$  Stunden auf  $85$  bis  $90^{\circ}$  C. erhitzt und einige Oesen von beiden Proben auf Nähr-Agar-Agar übertragen. Schon am nächsten Tage war auf beiden Proben ein intensiv grün gefärbter Belag von *Pyocyaneusbacillen* zur Entwicklung gelangt. Es ist immerhin möglich, dass der *Bacillus pyocyaneus* bis jetzt nicht nachgewiesene Sporen bildet, welche so klein sind, dass sie durch Berkefeldfilter hindurchgehen.

Bringt man eine minimale Menge *Pyocyanase* ( $1^{ms}$  der getrockneten Substanz) auf Nährgelatine, so wird die letztere bei  $22^{\circ}$  C. so energisch verflüssigt, dass in 24 Stunden der ganze Inhalt des Reagensglases in Flüssigkeit umgewandelt ist. Diese Eigenschaft ist von praktischem Werthe, da dieselbe neben der Wasserstoffsperoxydreaction ein einfaches Mittel bietet, um *Pyocyanase*präparate rasch auf ihre Wirksamkeit zu prüfen.

Auch Fibrin wird durch die *Pyocyanase* rasch gelöst.  $3^{com}$  des im Vacuum concentrirten Filtrates von *Pyocyaneusculturen* wurden mit  $2^{grm}$  Fibrinflocken versetzt und am Abend in den auf  $37^{\circ}$  C. eingestellten Brütschrank gestellt. Am nächsten Morgen waren die Fibrinflocken vollkommen gelöst. Nun wurden nochmals 1 bis  $2^{grm}$  Fibrin zugesetzt, welche schon nach 4 Stunden bei  $37^{\circ}$  C. gelöst waren.

Sehr interessant ist die Wirkung der alkalisch reagirenden *Pyocyanase* einerseits und einer stärker alkalisch gemachten, sowie einer saueren *Pyocyanaselösung* andererseits auf Hühnereiweiss.

Bringt man durch 10 Minuten langes Kochen coagulirtes Hühnereiweiss mit einer sehr geringen Menge Enzym in wässriger Lösung ( $1^{ms}$ ) zusammen, so wirkt dies schon bei der geringen Temperatur von  $22^{\circ}$  C. sehr energisch auf das Hühnereiweiss ein und löst im Laufe von 12 Stunden mehrere Gramm. Viel energischer ist die Einwirkung des Enzyms jedoch, wenn man die schwache Alkalität der Lösung durch Zusatz geringer Mengen Alkali vermehrt. Bei einer Temperatur von nur  $22^{\circ}$  C. wurden durch eine solche, stärker alkalisch gemachte *Pyocyanaselösung*  $5^{grm}$  Hühnereiweiss in 12 Stunden vollkommen gelöst.

In einer schwach mit Salzsäure angesäuerten *Pyocyanaselösung* wird dagegen coagulirtes Hühnereiweiss unter den oben erwähnten Verhältnissen gar nicht gelöst.

Aus allen diesen Eigenschaften geht mit Sicherheit hervor, dass ein proteolytisches Enzym vorliegt, und zwar ein zu den Trypsinen gehörendes Bakterien-Enzym.

---

### Schlussbetrachtungen.

Aus unseren Untersuchungen ergeben sich die folgenden Schlüsse:

1. Der in den meisten Flüssigkeitsculturen von Bakterien, trotz des Vorhandenseins genügenden und geeigneten Nährmaterials, allmählich (d. h. nach Tagen oder Wochen) eintretende Stillstand der Entwicklung beruht auf der Entstehung enzymartiger Stoffe, welche von den Bakterien selbst gebildet werden und diese schliesslich wieder auflösen.

2. Es giebt bakteriolytische Enzyme, welche nicht nur die eigene Bakterienart (conforme Enzyme), sondern auch solche, welche verschiedene andere (auch pathogene) Bakterienarten aufzulösen vermögen (heteroforme Enzyme).

3. Die Heilung mit sogenannten „Stoffwechselproducten“ oder unfiltrirten Culturen der Bakterien beruht auf dem Vorhandensein bakteriolytischer Enzyme in den Culturen.

4. Die künstliche Immunisirung mit sogenannten „Stoffwechselproducten“ oder mit unfiltrirten Culturen pathogener Bakterien beruht darauf, dass sich allmählich im Blute eine haltbarere Verbindung zwischen dem bakteriolytischen Enzym der Bakterien und einem Eiweisskörper des Blutes oder mit Organeiwiss bildet. Dieses resultirende Immunproteid hat noch die bakteriolytischen Eigenschaften des ursprünglichen Enzyms.

5. Diese Vereinigung, welche im Thierkörper nur sehr langsam und bei grossen Verlusten an Enzym vor sich geht, kann in kurzer Zeit auch in vitro durch chemische Einwirkungen hergestellt werden. Man ist also jetzt im Stande, wenigstens bei einzelnen Infectionskrankheiten Heilserum ohne Zuhülfenahme des thierischen Organismus künstlich zu bereiten.

6. Die sogenannte Agglutination ist weiter nichts als das erste Stadium des bakteriolytischen Effectes des Enzyms.

7. Die Immunsera wirken bei Ausschluss von Luft im Allgemeinen weit energischer bactericid, als bei Luftzutritt, was man bisher vollständig übersehen hat. Aber auch bei Luftzutritt kann man bei hoher Concentration der Bakterienfermente (bezw. Immunproteidine) stark bactericide Wirkungen gewisser Immunsera beobachten.

8. Es giebt Bakterien-Enzyme, welche im thierischen und menschlichen Organismus nicht nur bactericid, sondern auch toxinvernichtend wirken. So ist z. B. das Enzym des *Bacillus pyocyaneus* (Pyocyanase) im Stande, die krankmachende und tödtliche Wirkung des Diphtherietoxins vollständig aufzuheben.

9. Die Pyocyanase dürfte nach den mitgetheilten Experimenten an Thieren zur erfolgreichen Behandlung des Milzbrandes, der Diphtherie, der Pest u. s. w. geeignet sein.

10. Durch das in vitro dargestellte Pyocyanase-Immunprotein kann ein hoher Grad von mindestens 14tägiger Immunität gegen Milzbrand erzielt werden.

11. Die bei der Pyocyanasebehandlung von Milzbrand u. s. w. eintretende Erhöhung der Körpertemperatur um ca. 1° C. ist lediglich die Folge der Enzyminjektion. Ein Einfluss der bei der Auflösung der Bakterien in's Blut gelangenden Bakterienproteine auf die Körpertemperatur tritt meistens nicht hervor, wahrscheinlich, weil die letzteren durch das Enzym nicht nur gelöst, sondern gleich weiter zersetzt werden.

12. Die baktericide Wirkung des normalen Blutes wird wahrscheinlich ebenfalls durch enzymartige Stoffe verursacht. Hierfür spricht unter Anderem der Umstand, dass auch durch normales Blutserum bei höherer Concentration Agglutination bewirkt wird.

Die bekannte Beeinflussung des Anthrax durch *Bacillus pyocyaneus* wollen Woodhead und Wood<sup>1</sup> durch den „Antagonismus der Gifte“, Bitter<sup>2</sup> durch „Stoffwechselproducte“, Blagovetschewski<sup>3</sup> durch die flüchtigen Producte (Ausdünstung) erklären. Die hemmende Wirkung, welche der *Pyocyaneus* in seinen eigenen Culturen erfährt, sucht Bitter im reichlich gebildeten Alkali und in der Erschöpfung des Nährbodens; die Hemmung, welche der *Schweinerothlaufbacillus* in seinen eigenen Culturen erfährt, sucht er dagegen in einer Säureproduction.

Nach unseren Erfahrungen spielen aber die unter den sogenannten Stoffwechselproducten befindlichen Enzyme die erste Rolle bei diesen Hemmungen der Culturen, oder diesen Beeinflussungen fremder Bakterienarten. Hierfür spricht auch die Thatsache, dass trotz reichlichen Vorhandenseins der nöthigen Nahrungsstoffe und trotz der Neutralisation gebildeter Säure kein neues Wachstum in den Culturen stattfindet.

Die Pyocyanase ist besonders dadurch vortheilhaft ausgezeichnet, dass sie, direct intravenös injicirt, keine erheblichen Störungen durch Lösung von Blutkörperchen hervorruft, obgleich sie befähigt ist, Fibrin aufzulösen. Ganz anders ist das Verhalten des Pankreassaftes, welcher, wie Nencki und Tschipurkowski<sup>4</sup> feststellten, einem Kaninchen intravenös injicirt, öfters schon in Dosen von 1.5<sup>ccm</sup> in wenigen Minuten bis einigen Stunden

<sup>1</sup> *Compt. rend. de l'Acad.* T. CIX. Nr. 26.

<sup>2</sup> Baumgarten's *Jahresbericht*. 1891.

<sup>3</sup> *Ebenda*. 1890. S. 538. — *Annales de l'Institut Pasteur*. 1890. p. 11.

<sup>4</sup> *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXIII. Nr. 19 u. 20.

den Tod des Thieres durch Fibringerinnung, Verstopfung der Blutgefäße, Stauung des venösen Blutes und dadurch bedingte geringe Füllung des linken Herzens, sowie Sinken des Blutdruckes herbeiführt.

Nach jenen Autoren enthält der Pankreassaft auch etwas Fibrin-ferment. Indessen ist doch die Möglichkeit noch vorhanden, dass die Blutgerinnung auch indirect durch Tödtten und Lösung der Leukocyten erfolgte. Nicht alle Bakterien-Enzyme dürften indess so harmlos sein, wie die Pyocyanase; denn die im Vacuum concentrirten und filtrirten Culturen der Erysipelstreptokokken lösen die rothen Blutkörperchen bei intravenöser Injection auf.

Bei intravenöser Injection selbst sehr grosser Mengen von Pyocyanase entsteht bei Kaninchen eine rasch vorübergehende Temperatursteigerung von ca.  $1^{\circ}$  C. So betrug die Körpertemperatur bei einem 2522<sup>gmm</sup> schweren Kaninchen, welchem 0.02<sup>gmm</sup> reiner, aus der concentrirten und filtrirten Cultur gefällten, trockenen Pyocyanase nach dem Lösen in schwach alkalischem sterilisirten Wasser, in eine Ohrvene injicirt worden waren, nach 4 Stunden  $40.1^{\circ}$  C. Vor dem Versuche war die Körpertemperatur  $39.4^{\circ}$  C. und ebenso hatte dieselbe 12 Stunden nach der Injection wieder die normale Höhe, nämlich  $39.3^{\circ}$  C.

Nicht jede Bakterienart scheidet proteolytische Enzyme aus, wie längst bekannt ist. Manche Arten sind so exclusiv parasitär geworden, dass sie mit der leichteren Aufnahme bereits gelöst vorhandener Nährstoffe die Fähigkeit ganz verloren haben, auch ungelöste Nahrungsstoffe durch herzustellende Enzyme zu lösen. Hierher gehört besonders der Tuberkelbacillus, der keine Enzyme — wenigstens keine hier in Betracht kommenden — zu bilden scheint. Heilung mit abgetödteten Culturen, oder mit den Presssäften desselben ist deshalb naturgemäss unmöglich. Ebenso ist jede Bemühung vergebens, hier ein Heilserum in ähnlicher Weise wie für Diphtherie herzustellen. Wohl wäre es aber denkbar, dass gewisse andere Bakterien Enzyme ausscheiden könnten, welche auch den Tuberkelbacillus lösen, und dann wäre wohl auch Heilung und Immunisirung mit einem daraus nach unserer Methode herzustellenden Immunproteïdin denkbar. Ein nicht zu unterschätzendes Hinderniss für das genügende Eindringen eines Enzyms dürfte der hohe Fettgehalt sein, der nach de Schweinitz über ein Drittel der Trockensubstanz der Tuberkelbacillen beträgt.

Man könnte noch einwenden, dass nicht unser Enzym in Form des Pyocyanase-Immunproteïdin die Immunisirung bewirke, sondern dass es die von jenem Enzym während der Entwicklung der Culturen gelösten Proteïne des Bakterienprotoplasmas selbst sind, welche, in haltbarere Form in's Thier gebracht, das wirksame immunisirende Agens

bilden. Ist schon an und für sich diese Hypothese eine gezwungene, so wird sie noch dadurch höchst unwahrscheinlich, dass die proteolytischen Enzyme der Bakterien bekanntermassen sich nicht mit dem blossen Lösen und Peptonisiren begnügen, sondern die peptonisirten Proteine auch leicht weiter in die bekannten Basen und Amidosäuren spalten, worauf diese weiter vergohren werden, wenn kräftige Bacillen vorhanden sind. In einer 4 Wochen alten *Pyocyaneuscultur* dürften deshalb Plasmaproteine nur in verschwindenden Mengen unzersetzt noch in Lösung sein.

Die Bakteriologen, welche sich in neuerer Zeit mit den Giftstoffen der Bakterien experimentell beschäftigt haben, sind der übereinstimmenden Ansicht, dass die Giftstoffe sich in der Zellsubstanz der Bakterien befinden, so dass sie also auch in den von Buchner, Koch u. A. hergestellten Presssäften der Bakterien, in den sogenannten Plasminen enthalten sind.

Nach R. Pfeiffer<sup>1</sup> sind z. B. die Giftstoffe bei Typhus- und Cholera-bacillen sehr labiler Natur und hauptsächlich an die Bakterienkörper gebunden. Selbstverständlich können auch in den von den Bakterien befreiten Flüssigkeitsculturen solche aus den Bakterienkörpern stammende Giftstoffe enthalten sein, weil ja die meisten pathogenen Bakterien Enzyme bilden, welche eine gewisse Zahl von Bakterien mit der Zeit auflösen, so dass auch die Giftstoffe in Lösung gehen. Jedenfalls ist aber die Giftmenge in der Flüssigkeit gering, weil in frischen Culturen noch wenig Bakterien aufgelöst sind, während in älteren nicht bloss Lösung, sondern, wie oben ausgeführt wurde, eine weitere Zersetzung der an und für sich sehr labilen Giftstoffe stattfindet.

Es war daher entschieden ein Missgriff, wenn man die Presssäfte der Bakterien, die Plasmine, zur Heilung und Immunisirung bei Infectionskrankheiten anwenden wollte. Es kann hierdurch nur eine Vergiftung, aber keine Heilung des kranken Organismus erzielt werden.

Wir sind aber weit entfernt davon, den betreffenden Autoren, welche die Plasmintherapie zuerst versucht haben, einen Vorwurf zu machen. Wir müssen im Gegentheil die betreffenden Versuche als sehr verdienstvoll bezeichnen. Man wusste zwar schon lange, dass die Zellsubstanz der Bakterien giftige und pyogene Stoffe enthält, aber die Erkenntniss des Chemismus des Heilungs- und Immunisierungsvorganges war noch zu unvollkommen, so dass die Vermuthung, es könne hierbei auch der Zellinhalt der Bakterien und die Umwandlung der Giftstoffe in immunisirende Substanzen eine Rolle spielen, nicht von der Hand zu weisen war. Erst jetzt, nachdem wir die Bedeutung der bakteriolytischen Enzyme für Heilung

---

<sup>1</sup> *Deutsche med. Wochenschrift.* Bd. XX. S. 898.

und Immunisirung erkannt haben, können wir die erwähnte Vermuthung als unrichtig bezeichnen.

Wenn nach Injection von Presssäften der Bakterien (Bakterienplasma) Heilungserscheinungen wirklich beobachtet wurden, so kann dies nur in einer Beimengung von Enzym oder Zymogen bedingt gewesen sein.

Hier sei auch der interessanten neuen Untersuchungen von Nencki, N. Sieber und E. Schoumow-Simanowski<sup>1</sup> über die Entgiftung der Bakterientoxine durch die Verdauungsfermente gedacht. Dieselben zeigten z. B., dass der pankreatische Saft im Darne das Diphtherietoxin vernichtet.

Es liegt daher der Schluss nahe, dass auch die Pyocyaneustoxine in unserer concentrirt hergestellten Pyocyaneus-Fermentlösung durch die Pyocyanase selbst zerstört wurden.<sup>2</sup> Damit stimmt überein, dass wir keine besonderen Krankheitserscheinungen bei der Injection unserer concentrirten, fermentreichen Flüssigkeit wahrgenommen haben.

Es begreift sich nunmehr leicht, dass ein antibakterielles Serum zu gleicher Zeit ein antitoxisches sein kann, indem die Bakterien-Enzyme des Immunserums nicht nur die Bakterien, sondern auch die Toxine zerstören. Wenn andererseits ein antitoxisches Serum nicht zugleich baktericid wäre, so müssten sich ja die betreffenden Bakterien, deren Gift allein zerstört werden soll, in's Unendliche im Thierkörper vermehren. Die Alexinwirkung kommt ja nach einer gewissen Ausbreitung der Infection nicht mehr in Betracht.

Die Erscheinung der Agglutination wurde in ihrer Ursachè sowohl, als in Bezug auf das Verhältniss zur Heilung verschieden beurtheilt. Nach Nicolle<sup>3</sup> soll sie auf der Anwesenheit einer Substanz in der Bakterienhülle bestehen, welche von dem entsprechenden Serum zur Gerinnung gebracht wird. Damit ist wohl die weitere Behauptung Nicolle's sehr schwer zu vereinbaren, dass diese Substanz sehr widerstandsfähig gegen Alkalien und Säuren sei und sich in absolutem Alkohol und Aether löse (!). Nach ihm steht diese Substanz auch nicht zu den Toxinen und zu den immunisirenden Stoffen in irgend einer Beziehung.

Trumpp beobachtete, dass irgend welche indifferente schleimige Substanzen bei Cholera- und Typhusmikroben Verklebung und Haufenbildung ebenfalls erzeugen können. Bezüglich der Bedeutung der Agglutination urtheilt dieser Autor folgendermassen:

„Nach alledem erscheint das Phänomen der Agglutination als der sichtbare Ausdruck einer, durch die specifischen Immunsera bedingten,

<sup>1</sup> *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXIII. Nr. 19 u. 20.

<sup>2</sup> Zum Theil können die Toxine allerdings auch durch Dialyse entfernt worden sein, welche wir behufs Reinigung unserer Enzymlösung vornahmen.

<sup>3</sup> *Annales de l'Institut Pasteur*. T. XII. p. 161.

tiefer greifenden Schädigung der Bakterienzelle, die allerdings nur als eine vorübergehende, nicht unmittelbar die Lebensfähigkeit vernichtende, aufzufassen ist.

Die Bakterienzelle erweist sich aber in diesem Zustande bedeutend angreifbarer für den Einfluss der activen Alexine normalen Blutserums, und dies ist der Grund für die antibakterielle Schutzwirkung der speci- fischen Cholera- und Typhus-Immunsera und zugleich die nähere Er- klärung für das Wesen der Immunität bei beiden bakteriellen Infectionen.“<sup>1</sup>

Die „active Betheiligung des Thierkörpers“ dürfte nicht in der Ver- wendung der Alexine zur Tödtung der agglutirten Bakterien bestehen, sondern nach unserer Auffassung in der Ueberführung des bakteriolytischen Enzyms in eine hochmoleculare, haltbarere Form im Thiere, welche nicht im täglichen Stoffwechsel zersetzt wird. Da, wie wir nachgewiesen haben, die bakteriolytischen Enzyme, oder die daraus im Organismus sich bildenden Immunproteidine die pathogenen Bakterien bei dem im Thierkörper be- stehenden Sauerstoffmangel vernichten und auflösen, so ist es nicht nöthig, auch noch die Alexinwirkung zur Erklärung des Chemismus der erworbenen Immunität heranzuziehen.

Gruber glaubt, dass seine hypothetischen Agglutinine irgendwo im Körper aufgespeichert sind und allmählich dem Blute zugeführt werden, wo sie dann der Zerstörung anheimfallen; Arloing dagegen meint, dass diese Zerstörung in Leber und Milz vor sich gehe.<sup>2</sup>

Nach Pfeiffer ist die Agglutination lediglich eine entwickelungs- hemmende Eigenschaft des Immunserums, und kommt die bactericide Substanz nur im und durch den Thierkörper zur Geltung.

Nach unserer Ansicht liegt in dem Wesen der Agglutination auch wieder eine Schutzwirkung für die Bakterien selbst; denn die im Inneren der gebildeten Klümpchen eingehüllten Bakterien entgehen ja eine Zeit lang dem Angriffe des fermentartig wirkenden Immunproteidins.

Nachdem wir nachgewiesen haben, dass die Agglutination nichts Anderes ist, als eine durch die bakteriolytischen Enzyme bewirkte Ver- änderung der Bakterienzelle, erscheint diese bisher so räthselhafte Er- scheinung völlig klargestellt. Die Bakterien, deren Membran durch die Enzymwirkung verquollen und theilweise aufgelöst ist, haben die Fähig- keit der vegetativen Thätigkeit verloren, dieselben sinken zu Boden und werden bei beschränktem Sauerstoffzutritt, wie er auch im thierischen und

<sup>1</sup> Trumpp beobachtete auch bereits, dass der schädigende Einfluss der Ag- glutination durch die Immunsera um so grösser ist, je stärker die Agglutination selbst eintritt, was man freilich schon a priori hätte erwarten dürfen. *Diese Zeit- schrift.* 1897.

<sup>2</sup> *Soc. nat. de méd. de Lyon.* Februar 1897.

menschlichen Körper besteht, bald ganz, bis auf unlösliche Reste (gewisse anorganische Stoffe, Fett u. s. w.), aufgelöst.

Den Umstand, dass die Immunsera zwar im Thierkörper, nicht aber *in vitro* baktericid wirken, erklärte ganz neuerdings ein Schüler Metschnikoff's durch die Annahme, das Immunsorum wirke als Stimulanz auf diejenigen Körperzellen, denen die Vertheidigung des Organismus gegen die Bakterieninvasion obliegt. In ganz ähnlicher Weise erklärten andere Autoren die baktericide Wirkung der Immunsera im Thierkörper und die Wirkungslosigkeit *in vitro* damit, dass sie annahmen, das Immunsorum verursache eine „Umstimmung“ des thierischen Körpers. Damit ist aber eigentlich keine Erklärung dieser Vorgänge gegeben; denn es bleibt völlig dunkel, was wir uns unter dieser „Umstimmung“ oder unter der stimulirenden Wirkung vorstellen sollen.

Durch unsere Untersuchungen wurde für Cholera und Typhus bewiesen, dass bei der grossen Verschiedenheit der Wirkung des Immunsorums innerhalb und ausserhalb des Körpers der Luftabschluss, wie er in der Bauchhöhle, im subcutanen Gewebe u. s. w. mehr oder weniger vollkommen besteht, die Hauptrolle spielt; denn wir haben gezeigt, dass Typhus- und Choleraimmunsorum bei Sauerstoffabschluss auch *in vitro* sehr energisch baktericid wirkt. Bei Sauerstoffabschluss sind die Bakterien nicht mehr im Stande, sich durch oxydative Thätigkeit gegen die Angriffe des Enzyms, bezw. bakteriolytischen Immunproteïdins zu wehren und einen Theil desselben unwirksam zu machen; die wehrlosen Bakterien werden deshalb durch letzteres rasch und leicht aufgelöst. Damit ist das räthselhafte Phänomen durch einen höchst einfachen und natürlichen Umstand — den Sauerstoffabschluss, welcher die bakteriolytische Thätigkeit des Immunproteïdins erleichtert — in vollkommen befriedigender Weise erklärt, und wir brauchen nicht mehr zu so unbestimmten Hypothesen, wie die oben genannten, unsere Zuflucht zu nehmen.

Ausser dem Sauerstoffabschlusse oder Luftmangel kommen im thierischen und menschlichen Körper allerdings noch einige andere, den bakteriolytischen Effect und die Energie der Enzyme oder Immunproteïdine begünstigende Umstände in Betracht, welche den geringen Unterschied, der in Bezug auf die bakteriolytische Wirkung *in vitro* bei Sauerstoffabschluss und im Thierkörper vielleicht noch bestehen mag, ganz erklärlich erscheinen lassen. Ausser anderen Verhältnissen von untergeordneter Bedeutung dürfte im lebenden Körper, wie erwähnt, auch der Umstand von grossem Einflusse sein, dass Bakterienconglomerate durch den Blutkreislauf, die Darmperistaltik u. s. w. zu Einzelindividuen oder kurzen Ketten von solchen zertheilt werden, so dass sie nun leichter von dem im ganzen Organismus verbreiteten Enzym oder Immunproteïdin aufgelöst

werden können. In ausserordentlichem Maasse wird weiterhin der bakteriolytische Effect gewisser Nucleasen durch die alkalische Reaction des Blutes erhöht. So haben wir, wie oben erwähnt, für die Pyocyanaase nachgewiesen, dass die eiweisslösende Wirkung in sauren Medien sehr gering, in schwach alkalischen bedeutend und in stark alkalischen ausserordentlich energisch ist.

Verschiedene, bisher ganz unerklärliche Beobachtungen über die baktericide Wirkung der Immunsera finden nach den oben besprochenen Thatsachen eine vollkommen befriedigende Erklärung, so z. B. das folgende, höchst interessante Versuchsergebnis, über welches R. Pfeiffer<sup>1</sup> berichtet: „Es ist möglich, Verdünnungen des Serums mit Bouillon herzustellen, welche im Reagensglase so gut wie gar keine abtödtenden Wirkungen auf die Choleraerkrankung entfalten, welche sogar für diese Mikroorganismen ein gutes Nährsubstrat abgeben, während andererseits dieselben Serum-bouillongemische im Peritoneum des Meerschweinchens die stärksten Vibrionen auflösenden Effecte veranlassen. Ja noch mehr. Ich besäete derartige Bouillonverdünnungen des Serums mit Choleraerkrankungsvibrionen und stellte sie 24 Stunden in den Brutschrank. Die Röhren waren nach Ablauf dieser Zeit durch die massenhafte Entwicklung lebhaft schwärmender Vibrionen stark getrübt. Wenn ich nun zu 1<sup>0000</sup> dieses sicherlich aller baktericiden und entwicklungshemmenden Substanzen beraubten Bouillonserumgemisches noch 1 Oese virulenter Choleraerkrankungscultur hinzufügte und dann die so gewonnene Aufschwemmung neuen Meerschweinchen intraperitoneal injicirte, so erhielt ich vollständig typische, in 20 Minuten sich abspielende Vibrionenauflösung.“ Dieses Versuchsergebnis erschien Gruber so merkwürdig, dass derselbe, an eine Täuschung glaubend, darüber sagte: „Wäre das wahr, so wäre bewiesen, dass die Glabrificine mit dem Schutzvorgange nichts zu thun haben.“ Das, was R. Pfeiffer fand, ist ohne Zweifel wahr und erklärt sich einfach aus dem Umstande, dass die Choleraerkrankungsvibrionen im Reagensglase eine gewisse Menge des bakteriolytischen Immunproteids durch Oxydation unwirksam machten, während dieselben in der Bauchhöhle des Meerschweinchens bei vollkommenstem Luftabschlusse wehrlos waren, so dass sie nun von der geringen Menge noch vorhandenen Immunproteids leicht und rasch aufgelöst wurden, zumal durch die Darmperistaltik die Agglutination verhindert wird, welche im Reagensglase die im Inneren der Klümpchen gelagerten Vibrionen gegen die Angriffe der Enzymverbindung schützt.

Aus unseren Untersuchungen ergeben sich zahlreiche neue Gesichtspunkte in Bezug auf die Fragen der künstlichen Immunität und die

---

<sup>1</sup> *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde.* 1896. Bd. XX. S. 130.

Heilung von Infectionskrankheiten. So dürfte es voraussichtlich bald gelingen, Heilserum auf künstlichem Wege, ohne Zuhülfenahme des thierischen Organismus, in viel kürzerer Zeit, als es bisher möglich war, herzustellen.

Um z. B. ein genügend wirksames Diphtherie-Heilserum von Pferden zu erzielen, sind so oft wiederholte Injectionen der abgetödteten Bakterien-culturen nöthig, dass die Immunisirung 4 bis 6 Monate beansprucht. Auch nach der verbesserten Methode von Pawlowsky und Maksutow nimmt die Behandlung noch 40 bis 50 Tage in Anspruch. Nach unserer Ansicht ist mit diesen Methoden enormer Zeit- und Materialverlust verbunden. Das Bakterien-Enzym — Diphtherase von uns genannt — wird offenbar zum grössten Theile im Thierkörper zerstört, fällt dem Stoffwechsel anheim, bevor es sich mit dem Proteïdin des Blutes zu dem weit haltbareren Stoffe, dem Diphtherase-Immunproteïdin, verbinden kann, welcher bei seiner hochmolecularen Beschaffenheit weniger leicht in die Thierzellen einzudringen vermag und daher besser vor der Zerstörung geschützt ist. Wie es uns nun bei der Pyocyanase gelungen ist, dieselbe auf chemischem Wege mit Blut-, bezw. Organeiweiss zu verbinden und so ein Immunproteïdin herzustellen, welches als hochmolecularer Körper weniger leicht im Thierkörper zerstört wird und deshalb immunisirende Wirkungen entfaltet, so dürfte es nach derselben, von uns angewendeten Methode möglich sein, auch Diphtherase-, Cholerase-, Typhase-Immunproteïdin u. s. w. künstlich zu bereiten.

Ueber diese Methode und über diesbezügliche Versuche werden wir in einer weiteren Abhandlung berichten.

Durch das Resultat der oben beschriebenen Untersuchungen und Ueberlegungen ist der bakteriologischen Forschung ein grosses und dankbares Feld eröffnet; zahllose neue Fragen harren der Bearbeitung, und der praktischen Medicin erwächst die Aufgabe, die durch das Experiment am Thiere festgestellte Heil- und Schutzwirkung der bakteriolytischen Enzyme (Nucleasen) und Immunproteïdine auch bei menschlichen Infectionskrankheiten zu erproben.

Zur Bekämpfung von Thierseuchen, insbesondere von Milzbrand, dürfte die Pyocyanase- und Pyocyanase-Immunproteïdin-Behandlung sich schon jetzt als erfolgreich erweisen.