

Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität in Straßburg. (Direktor: Prof. Dr. Forster.)

### **Ueber die Verwertung des Inhalts von Vesikatorblasen zu biologischen Untersuchungen.**

Von Dr. Carl Eisenberg, I. Assistenten am Institut.

Seitdem man außer dem Blutserum auch andere Bestandteile und die Abkömmlinge des Blutes zu biologischen Untersuchungen heranzieht, sind besonders zwei Materien für die Immunitätsforschung bedeutungsvoll geworden: die entzündlichen Exsudate und die Leukozyten. Nun ist aber die Anzahl der Infektionskrankheiten, welche mit Exsudatbildung einherzugehen pflegen, beschränkt, die Zusammensetzung der Exsudate schwankt außerordentlich je nach dem Alter und der Ausdehnung, und so erklärt sich die Schwierigkeit systematischer Untersuchungen. Andererseits fehlt es an einer Methode, welche die Leukozyten, diesen wesentlichen, nie fehlenden Anteil eines Exsudates direkt mit in das Bereich der Untersuchung zu ziehen gestattet. Ich möchte nun im folgenden darauf hinweisen, daß die durch Einwirkung von Cantharidin experimentell erzeugte Vesikatorflüssigkeit die genannten Mängel der Spontanexsudate nicht besitzt, sondern bei geeigneter Methodik für die Beantwortung gewisser, vorwiegend theoretisch interessanter Fragen verwertet werden kann.

Vesikatorblasen sind wiederholt auf ihren Gehalt an Agglutininen untersucht worden (cf. Palttauf<sup>1)</sup>), ein hämolytischer Versuch an dem Inhalt einer Cantharidenblase ist von H. Strauss und W. Wolff<sup>2)</sup> einmal angestellt worden.

Ich selbst ging von Versuchen aus, im Blut kreisende Mikroorganismen in künstlich erzeugten Exsudaten nachzuweisen; das führte mich dazu, die biologischen Eigenschaften dieser Exsudate zu prüfen, wobei eine Methode ausgebildet wurde, die für allgemeinere Zwecke verwertbar erschien.

Bestreicht man einem Menschen die Haut an der Außen- oder Oberseite eines Oberschenkels in einem etwa talergroßen Bezirk mit dem Collodium cantharidatum der Pharmakopoe und schützt die Stelle durch ein mit Heftpflaster armedes Uhrglas und einen leicht fixierenden Verband, so bildet sich innerhalb zwölf Stunden eine Blase, deren Inhalt für die Untersuchung ausreicht. Es empfiehlt sich, das Vesicans die Nacht über einwirken zu lassen, weil die Schmerzen, welche es erzeugt, zu gering sind, um den Schlaf zu stören, und so die Untersuchung meist ohne Belästigung des Patienten vorgenommen werden kann. Die Entnahme der Flüssigkeit geschieht am besten, indem man die Blase mit einer Pasteurschen Capillarpipette ansticht und vorsichtig mit dem Gummiballon aufsaugt. Impft man den so gewonnenen Inhalt auf unsere gewöhnlichen Nährböden, so kommen regelmäßig von der Haut stammende Keime zur Entwicklung.

Wollte ich daher entscheiden, ob auch aus dem Blut Keime in die Vesikatorblase übergehen, so mußte ich solche Patienten untersuchen, in deren Blut Bakterien kreisten, welche an der Haut nicht vorkommen. Ich habe deswegen mit gütiger Erlaubnis des Herrn Prof. Moritz bei einigen Kranken mit frischem, bakteriologisch nachgewiesenem Typhus Vesikatorblasen erzeugt und die sich ergebende Flüssigkeit mittels Gallevorkultur und durch direkte Aussaat auf Endoplaten auf das Vorhandensein von Typhusbazillen untersucht. Niemals gelang mir in diesen Fällen der Nachweis der Bakterien im Exsudat.

Es war nun möglich, daß die Bakterien zwar durch die Wand der Hautgefäße in das Exsudat übergetreten, dort aber zugrunde gegangen waren und sich deswegen dem kulturellen Nachweis entzogen. Es galt also, nach bakterienschädigenden Ursachen im Exsudat zu suchen. Als solche kamen zunächst die Spuren Cantharidin in Frage, welche sich im Vesikatorinhalt finden; ihre antiseptische Kraft gegenüber dem Typhusbacillus scheint jedoch gering zu sein, denn in unverdünntes Collodium cantharidatum geimpfte Typhusbazillen konnte ich noch nach drei Tagen daraus fortzüchten. Nicht so leicht zu entscheiden war die Frage, ob nicht die Typhusbazillen der bakteriziden Kraft des Exsudats erliegen waren. Nun konnte ich allerdings in einem frisch entnommenen Exsudattropfen Bakteriolyse gegenüber einem mittelvirulenten Typhusstamm auch nicht bei Verwendung von Verdünnungen beobachten; es war aber zu erwarten, daß in dieser Flüssigkeit, die bereits mehrere Stunden zwischen Epidermis und Cutis, also nicht eigentlich im Körperinnern gewellt hatte, keine spontane Bakteriolyse mehr stattfinden könnte. Eine solche konnte aber wohl einwirken zu der Zeit, als das Serum etwa mit den Bakterien zusammen zur Exsudatbildung ausgeschieden wurde; hätten doch in diesem Augenblick die Bedingungen ganz ähnlich gelegen wie im Pfeifferschen Versuch.

Ich ließ deshalb einem Typhuskranken auf die mit Collodium cantharidatum bestrichene und wie vorher geschützte Stelle dauernd Thermophorumschläge verabfolgen, durch die eine der Inaktivierungstemperatur nahe Wärme konstant erhalten wurde. Vielleicht konnte ich so das Exsudat gewissermaßen in statu nascendi inaktivieren oder zum mindesten abschwächen und etwa darin vorhandene abgetötete Typhusbazillen — welche ja sehr phagozytabel sind — innerhalb der Exsudatleukozyten wiederfinden. Nach zwölf Stunden durchsuchte ich sämtliche Leukozyten des Exsudats mit Hilfe der weiter unten angegebenen Methode, konnte aber in ihnen kein einziges Gram-negatives Stäbchen nachweisen.

Der negative Ausfall dieses Versuchs besitzt natürlich keine volle Beweiskraft, immerhin wollte ich ihn in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt lassen. Endlich habe ich noch am Meerschweinchen Versuche angestellt; hier gelingt es bisweilen, bei ausgewachsenen Tieren auf der Rückseite der Ohr-

muschel eine kleine Blase zu erzeugen, wenn man Collodium cantharidatum aufstreicht und das Ohr durch eine darübergestülpte, mit Heftpflaster armierte Zelluloidkapsel schützt. Verfuhr ich so und impfte gleichzeitig eine untödtliche Dosis Typhus- oder Pyocyaneusbazillen intraperitoneal, so konnte ich nach zwölf Stunden wohl aus dem Blute, niemals aber aus dem Blaseninhalt die betreffenden Bakterien züchten.

Daß aus den tiefen Schichten der Haut unter gewissen Bedingungen Mikroorganismen in den Vesikelinhalt passieren, beweisen die drei mir erst kürzlich bekannt gewordenen Fälle von Levaditi und Petresco,<sup>3)</sup> welche Cantharidenpflaster auf syphilitische Papeln wirken ließen und dann die Spirochaeta pallida im Blaseninhalt nachweisen konnten. Soviel glaube ich jedoch meinen Befunden entnehmen zu können, daß die durch das Cantharidin auf der unveränderten Haut erzeugte Läsion zu gering ist, um einen Uebergang von Bakterien in den Blaseninhalt zu ermöglichen.

Hatte ich bei der Prüfung der bakteriziden Kraft mit der Möglichkeit des Mangels an entsprechendem Komplement rechnen müssen, so konnte mit Hilfe des Hämolyseversuchs gezeigt werden, daß eine andere Komplementart wenigstens in der Vesikatorflüssigkeit enthalten ist. Gab ich nämlich 0,1 ccm frisch entnommenen Exsudats zu einer Mischung von Hammelblut und vollständig lösender Menge entsprechenden Ambozeptors, so trat alsbald Hämolyse ein, während das Ausbleiben der Lösung von nichtsensibilisierten Blutkörperchen zeigte, daß dabei hämolytisches Komplement und nicht etwa hämotoxische, aus dem Vesicans stammende Substanzen wirksam waren. In ähnlicher Weise bestätigte ich den von Strauss und Wolff<sup>2)</sup> erhobenen Befund des Uebergangs hämolytischer Ambozeptoren in den Vesikatorinhalt, indem ich bei Zusatz von 0,1 ccm inaktivierten Exsudats zu einer Mischung von Blut und 0,1 ccm Meerschweinchenserum Hämolyse eintreten, in dem wie vorher angestellten Kontrollversuch dagegen ausbleiben sah.

Die an diesen Befund geknüpfte Erwartung, daß auch die bei der Komplementbindung wirksamen Immunkörper in den Vesikatorinhalt übergehen, bestätigte sich bei der Untersuchung des Vesikatorexsudats zweier Typhusrekonvaleszenten.

In dem einen Falle verwandte ich als Antigen Vollbakterien und sah teilweise Hemmung eintreten, in dem andern Falle erzielte ich bei Verwendung eines nach der Vorschrift von Leuchs<sup>3)</sup> hergestellten Extraktes vollständiges Ausbleiben der Hämolyse. Die verwandte Exsudatmenge betrug in beiden Fällen 0,2. Es empfahl sich jedoch, das Exsudat — aus dem der Fibrinpfropf sich absetzte und mit der Platinöse herausgehoben wurde — vor dem Inaktivieren zu verdünnen, weil die Flüssigkeit beim Erwärmen bisweilen etwas eingedickt wird. Ich verdünnte im Verhältnis 1:2,5. Dann enthielt 0,5 ccm der Verdünnung die zum Hauptversuch, 1 ccm die zu dem einen Kontrollversuch notwendige Menge. Es ist gerade dieser Kontrollversuch unerlässlich, welcher zeigen soll, daß nicht etwa aus dem Vesicans antikomplementäre Substanzen in den Blaseninhalt übergegangen sind.

Diese Befunde beanspruchen lediglich theoretisches Interesse; es liegt mir fern, etwa die Vesikatorflüssigkeit anstatt des Blutserums zur Anstellung des Komplementbindungsversuchs empfehlen zu wollen. Denn der Vorteil, den ein solches Verfahren haben könnte und der auf dem geringeren Gehalt des Exsudats an Hammelblutambozeptoren beruht, dürfte durch einen entsprechenden Mangel an spezifischen komplementbindenden Immunkörpern aufgewogen werden, und außerdem besitzen wir — wie ich hier nur kurz andeuten will — in vielen Fällen ein erwünschtes Mittel, die lytische Kraft der zu untersuchenden Flüssigkeit zu kompensieren, indem wir ihr ein Plus von antilytischem Antigen entgegensetzen.

Mit gutem Rechte konnte ich in den bisher mitgeteilten Versuchen von dem Gehalt der Vesikatorblasen an Körperzellen absehen. Die Menge der in dem Cantharidinexsudat enthaltenen Leukozyten ist nämlich so gering, daß sie den Ausfall der serologischen Reaktion gewiß nicht beeinträchtigt. Andererseits mußte aber das Vorhandensein von Phagozyten zur experimentellen Verwertung herausfordern angesichts der Erfolge, welche die biologische Betrachtungsweise des Nebeneinander von Körperflüssigkeiten und Zellen gezeitigt hat.

1) Kollé-Wassermann, Handbuch der pathologischen Mikroorganismen, Bd. 4, S. 677. — 2) H. Strauss u. W. Wolff, Ueber das hämolytische Verhalten seröser Flüssigkeiten. Fortschritte der Medizin 1902, Bd. 20, S. 2.

1) Presse médicale, 30. September 1905, S. 617. — 2) l. c. — 3) J. Leuchs und Chr. Schöne, Zeitschrift für Hygiene 1908, Bd. 60, H. 1, S. 149.

Wenn die Leukozyten der Spontanexsudate des Menschen nach dieser Richtung bisher unberücksichtigt geblieben sind, so geschah das mit Recht deswegen, weil man über ihre Dignität wenig aussagen kann. Anders bei den „Vesikatorleukozyten“. Von ihnen kennen wir die Entwicklungsstufe, das Alter ihres extravasalen Lebens und ihr Lösungsverhältnis in der umgebenden Flüssigkeit. Es handelt sich zum allergrößten Teil um mehrkernige Leukozyten, und zwar, wie wir annehmen dürfen, da nur verhältnismäßig wenigen der Durchtritt durch die Kapillärwände gelingt, um die wanderungsfähigsten, d. h. also auch die phagozytosefähigsten. Es ist das deswegen von Wert, weil eine biologische Einschätzung der Leukozyten ja hauptsächlich aus ihrer phagozytären Kraft gegenüber Infektionserregern gewonnen wird, also bei der Verwertung kräftiger Leukozyten der Ausschlag um so größer, die Fehlerquellen um so kleiner sein werden. Aus diesem Grunde ist das von manchen Autoren geübte Verfahren, aus experimentell erzeugten tierischen Exsudaten isolierte Leukozyten zur Bestimmung der opsonischen Kraft eines menschlichen Serums heranzuziehen, vorteilhaft. Daß aber die Verwendung von Leukozyten und Serum ein und desselben Individuums noch größere Vorteile bietet, erhellt ohne weiteres, wenn man bedenkt, daß trotz allem darauf verwandten Scharfsinn die Aufnahmefähigkeit der Leukozyten für Immunsustanzen noch nicht ausgeschlossen werden konnte.

Diesen Vorteilen, welche die Anstellung phagozytärer Versuche am Vesikatorinhalt zu bieten schien, standen Bedenken und Schwierigkeiten entgegen. Konnte das Cantharidin nicht die Leukozyten schwer geschädigt haben? Im Reagenzglas ließ sich die Cantharidinwirkung, wie sie stattgefunden haben mochte — zuerst konzentriert, mit der Bildung des Exsudats schwächer werdend — nicht nachahmen. Im hängenden Tropfen erwiesen sich die Leukozyten zwar als beweglich, aber wer ähnliche Versuche angestellt hat, weiß, wie schwer es ist, intakte Leukozyten von leicht geschädigten zu unterscheiden. Die Methylenblaureaktion endlich war deswegen nicht anwendbar, weil die Gegenwart der Hautkeime ihren Ausfall stören mußte. Ich konnte also eine gewisse Schädigung der Leukozyten nicht ausschließen. Es fällt dies jedoch nicht so schwer ins Gewicht, wenn man bedenkt, daß es zurzeit keine Methode gibt, um Leukozyten mit ganz indifferenten Mitteln zu isolieren; vielleicht ist die Behandlung mit Natrium citricum und das wiederholte Zentrifugieren nicht weniger schädlich als die Einwirkung des Cantharidins. Schließlich wurden die Bedenken gegen die Verwendung der Leukozyten durch den Ausfall eines Versuches zerstreut: Ich fand, wenn ich Reinkulturen von *B. coli* in ein exsudatenthaltendes enges Röhrchen impfte und 10 Minuten bei 37° reagieren ließ, die Leukozyten mit Bakterien vollgepfropft. Bei diesem Verfahren machte sich jedoch die geringe Anzahl der im Exsudat enthaltenen Leukozyten störend bemerkbar, denn es gelang nur, einige wenige mit dem Exsudat auf dem Objektträger auszustreichen, der Rest hatte sich während der Reaktionszeit an dem Rand des Röhrchens festgesetzt.

Nach mannigfachen Versuchen, möglichst viel Leukozyten zur Darstellung zu bringen und der Durchmusterung zugänglich zu machen, hat sich mir schließlich folgendes Verfahren brauchbar erwiesen.

Man gibt aus einer Kapillarpipette mit mittelweiter Mündung 10 Tropfen Bazillenemulsion auf einen peinlich gesäuberten Objektträger, welcher auf den Boden einer Petrischale gelegt wird, und verteilt die Flüssigkeit mit der flachaufgelegten Kapillare. Alsdann sticht man die Blase mit einer anderen Kapillarpipette an, saugt Exsudat mit dem Ballon auf und läßt sofort auf den Objektträger in gleichen Abständen nebeneinander 10 Tropfen der Flüssigkeit aus der Höhe einiger Zentimeter herabfallen. Dann deckt man die Petrischale mit dem Deckel zu, auf dessen Innenseite man ein Stück nassen Filtrierpapiers heftet, und stellt sie auf 15 Minuten in den Brutschrank bei 37°. Alsdann fährt man mit der Kante eines Deckgläschens, welches ebenso breit ist wie der Objektträger, über diesen sanft herüber, wie es bei der Aufbereitung von Blutpräparaten üblich ist. Dadurch wird die überstehende Flüssigkeit heruntergespült, und der Objektträger bleibt nur mit einer dünnen Schicht bedeckt. Jetzt wird die Petrischale, in die der Objektträger dann wieder zurückkommt, für ein paar Sekunden mit einem Deckel geschlossen, auf dessen Innenseite ein in Eisessig getränktes Stück

Filtrierpapier befestigt ist. Nachdem das Präparat nun lufttrocken geworden ist, wird es gefärbt, vorteilhaft nach Leishman, oder, wenn es sich um Gram-positive Bakterien handelt, nach Gram mit zarter Vesuvinegefärbung.

Hierzu ist zu bemerken, daß auf dem Objektträger die Phagozytose so gut stattfindet wie in einer Kapillare. Es ist sogar die Bewegungsfähigkeit der Leukozyten erhöht, wenn sie einen Stützpunkt finden. (So sieht man häufig in der Mitte eines hängenden Tropfens Leukozyten als bewegungslose Kugeln nach unten sinken, während sie am Rande dem Deckgläschen anhaften und von der freien Oberfläche Pseudopodien ausstrecken.) Nach 15 minütigem Aufenthalt auf dem Objektträger haben sich die Leukozyten darauf so ausgebreitet, daß sie durch sanftes Streichen mit der Deckglaskante davon nicht mehr entfernt werden. Es ist aber nötig, eine dünne Flüssigkeitsschicht zu erzielen, damit die Dämpfe des Eisessigs durchdringen können. Diesen verwende ich weniger seiner fixierenden Eigenschaft wegen, als weil er die Leukozyten momentan abtötet, ohne ihre Gestalt und Färbbarkeit zu beeinträchtigen.

Auf diese Weise erhält man eine große Menge Leukozyten auf einen Objektträger und kann sich leicht ein Urteil über die durchschnittliche Zahl der phagozytierten Bakterien bilden. Diese richtet sich natürlich nach der Konzentration der Bakterienlösung; ich bin von 14 stündigen Agarkulturen ausgegangen und habe, wenn es ging, mehrere Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung verwandt, im Durchschnitt solche, welche etwa 20 Keime in einem hängenden Tropfen enthielten. Für gewisse Zwecke habe ich auch größere Mengen gewählt.

Was nun das Resultat der bisher angestellten Versuche betrifft, so habe ich bei der Durchsicht aller Präparate den Eindruck gewonnen, daß die Phagozytose außerordentlich lebhaft gewesen ist. Ein Vergleich mit anderen Methoden zur Bestimmung der phagozytären Kraft ist natürlich nicht möglich, schon weil die Zahl der Leukozyten und die Konzentration des Serums eine ganz andere ist. Vergleichende Versuche sind vielmehr nur anzustellen, wenn man in beiden Fällen die hier angegebene Methodik verwendet.

So möchte ich heute über eine der Versuchsreihen berichten, welche ich anzustellen begonnen habe. Ich habe an der hiesigen chirurgischen Universitätsklinik bei einigen Patienten, denen zu therapeutischen Zwecken die Stauungsbinde nach Bier angelegt war, je eine Vesikatorblase an der durch Stauung geschwellenen und an der symmetrischen Stelle der nicht gestauten Extremität erzeugt und den Inhalt nach der hier angegebenen Methode untersucht. Dabei ergab sich, daß für *B. coli* und Staphylokokken in beiden Portionen die Phagozytose gleich stark war. Dieser Befund läßt zweierlei Deutung zu: einmal wäre es möglich, daß die phagozytäre Kraft im Stauungsgebiet nicht erhöht ist, dann aber könnte auch die sterile seröse Entzündung eine so vehemente Steigerung der phagozytären Kraft veranlassen, daß die durch einfache Hyperämie hervorgerufene dagegen verschwinden könnte. Die letztere Annahme würde nicht im Widerspruch stehen mit den Befunden Wrights<sup>1)</sup>, der in der Flüssigkeit chronischer Exsudate den opsonischen Index nur dann herabgesetzt fand, wenn er ihn für die Bakterienart bestimmte, welche in dem Exsudat gewachsen war.

Ich bin inzwischen darangegangen, meine Versuche nach zwei Richtungen zu vervollständigen, einmal, indem ich unter Verwendung einer exakt dosierbaren, leicht phagozytabeln Bakterienart, der Tuberkelbazillen, bei den einzelnen Versuchen nur die Konzentration der Bakterienaufschwemmung variere, und ferner, indem ich prüfe, wie sich bei Infektionen den aus dem Blute oder dem Infektionsherd gezüchteten Bakterienstämmen gegenüber die phagozytäre Kraft des Vesikatorinhalts an gestauten und nichtgestauten Stellen verhält.

**Resümee.** In den Inhalt der Vesikatorblasen gehen Bakterien aus dem Blute nicht über, wohl aber die daraufhin untersuchten Immunkörper. Mit Hilfe einer besonderen Methode ist man imstande, vergleichende Untersuchungen über die spezifische phagozytäre Kraft unter Benutzung der Vesikator-

1) A. E. Wright. Proc. of the royal soc. 1905. Ser. B. Vol. 77, S. 194.

leukozyten anzustellen. Diese Methode eignet sich zunächst zur experimentellen Bearbeitung des Problems der Stauung und der allgemeinen Pathologie der Entzündung.

---