

## XXIV.

**Ueber das Verhalten der Milzbrandbakterien im Organismus.**

Beitrag zur Phagocytenlehre.

Von Elias Metschnikoff.

Wie man in verflossenen Decennien gegenüber der Lehre vom parasitären Ursprung der Infectionskrankheiten gewöhnlich betonte, dass den Mikroorganismen dabei nur eine untergeordnete Rolle zukomme, da die Hauptsache in besonderen, von ihnen unabhängigen Giftstoffen liege, so wollen auch gegenwärtig mehrere Forscher nicht die bakterientötende Eigenschaft lebender Zellen anerkennen und versuchen es, durch Annahme unbekannter löslicher Fermente in thierischen Säften u. dgl. die Erscheinungen des Bakterientodes im lebenden Organismus zu erklären. Die Bakterienfrage konnte definitiv entschieden werden, da glücklicherweise manche pathogene Bakterien außerhalb des Organismus auf verschiedenen Nährsubstraten leicht cultivirt werden können, wobei sie ihre krankheitserregenden Eigenschaften nicht einbüßen. Ganz anders wäre die Sache, wenn anstatt der Bakterien andere Organismen (etwa Coccidien), welche nur innerhalb des Organismus gedeihen können, die Infectionskrankheiten verursachten. Eine ähnliche Schwierigkeit besteht in der Frage nach der Einwirkung lebender Zellen auf Bakterien, weshalb es leicht begreiflich ist, dass die meisten Einwände gegen die Phagocytenlehre sich auf diesem Punkte concentrirten.

Nachdem es gelungen war, den Gang der Infection und die dabei von gewissen Zellen ausgeübte Function bei durchsichtigen Daphnien zu ermitteln und dann eine ganze Reihe von That-sachen zu sammeln, welche auch für höhere Thiere auf eine mikrobentötende Eigenschaft lebender Zellen hinwiesen, musste ich nach einer Methode suchen, um die Wirkung der Zellen und

der Körpersäfte von einander zu trennen. Zunächst benutzte ich zu diesem Zweck die vordere Augenkammer, da das Kammerwasser bekanntlich eine ausserordentlich geringe Menge von Leukocyten enthält. Würde das Auswachsen der Milzbrandbakterien bei immunen Thieren nicht durch Zelleneinfluss, sondern durch Wirkung flüssiger Bestandtheile verhindert, so müsste eine Aussaat von Anthraxsporen in die vordere Augenkammer solcher Thiere von keinem Erfolge begleitet werden und das Wachsthum der Bakterien ganz ausbleiben. Unter dieser Voraussetzung brachte ich Milzbrandsporen in die vordere Kammer mehrerer Serien von Fröschen, mehrerer immuner Schafe und eines immunen Kaninchens ein. In sämmtlichen Fällen entwickelten sich reichliche Bakterienfäden, was eine Hypopyonbildung zur Folge hatte, wobei die Milzbrandbakterien durch eingewanderte Leukocyten bewältigt wurden. Mit diesen Resultaten mich nicht begnugend, wählte ich noch eine andere Methode, um die Phagocyten nicht nur auf kurze Zeit, sondern definitiv zu beseitigen. Ich nahm, auf Vorschlag des Herrn Krutizky in Petersburg, sehr feine Säcke aus dem Marke des gewöhnlichen Schilfrohrs und füllte dieselben mit sporenhaltigen Seidenfäden. Die an beiden Enden zugebundenen Säckchen liessen durch ihre Membran nur Flüssigkeiten, dagegen keine zelligen Elemente durchgehen, so dass man bequem den Einfluss der letzteren ausschliessen konnte. Nach Einführung solcher Säckchen unter die Rückenhaut von grünen Fröschen konnte ich ausnahmslos ein üppiges Auswachsen der Milzbrandfäden constatiren, obwohl die zugleich frei eingeführten sporenhaltigen Seidenfäden steril blieben. Ueber diese beiden Versuchsreihen publicirte ich im Juli 1887 eine Mittheilung in einer so bekannten Zeitschrift, wie es die „Annales de l'Institut Pasteur“<sup>1)</sup> sind, und doch ist sie von den Gegnern der Phagocytenlehre entweder gar nicht oder nur ganz flüchtig berücksichtigt worden. Der systematische Antagonist der Theorie der Phagocyten, Prof. Baumgarten, obwohl zugleich Berichterstatter über sämmtliche Arbeiten auf dem Gebiete der Bakteriologie, ignorirt<sup>2)</sup> meine citirte Abhandlung gänzlich und auch

<sup>1)</sup> Annales de l'Institut Pasteur. 1887. No. 7. p. 321.

<sup>2)</sup> Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den pathogenen Mikroorganismen. Jahrg. III.

seinem Schüler Petruschky<sup>1)</sup>), welcher eine Dissertation gegen die Wirkung von Phagocyten auf Milzbrandbacillen beim Frosche neulich veröffentlichte, ist dieselbe unbekannt geblieben. Wenn gleich Flügge und seine Schüler Bitter und Nuttall, mit welchen zusammen er eine Kritik der Phagocytenlehre verfasste<sup>2)</sup>, die genannte Abhandlung kannten, so haben sie trotzdem die betreffenden Versuche, welche Hüppé<sup>3)</sup> geradezu als „experimentum crucis“ bezeichnete, nur wenig berücksichtigt. Bitter<sup>4)</sup> glaubt z. B., dass bei meinen Milzbrandversuchen in der vorderen Augenkammer und mit Schilfrohrsäckchen „ein Absterben der Mikroorganismen in den Körpersäften zunächst dadurch gehindert war, dass dieselben in Sporenform eingebracht wurden, der gegenüber der Körper relativ machtlos zu sein scheint“. Nun werden aber die Milzbrandbakterien in der vorderen Kammer und in den Säckchen nicht allein in Sporenform erhalten, sondern hauptsächlich in Gestalt ausgewachsener vegetativer Bakteridien, welche noch wochenlang lebendig bleiben. Wenn somit Milzbrandsporen bei Ausschluss der Phagocyten, unter directer Wirkung der Körpersäfte immuner Thiere, auskeimen und wachsen können, während sie dies beim Zutritt von Phagocyten nicht thun (die in Zellen eingeschlossenen ungekeimten Sporen können dabei natürlich ihre Lebensfähigkeit noch behalten), so beweist dies eben, dass das Kammerwasser und der flüssige Inhalt des Schilfrohrsäckchens keine deletäre Wirkung auf Milzbrandbakterien ausüben. Wenn Bitter weiter bemerkt, dass „die im vorderen Kammerwasser aus den

<sup>1)</sup> Untersuchungen über die Immunität des Frosches gegen Milzbrand. Inaug.-Diss. Jena 1888.

<sup>2)</sup> Flügge, Bitter u. Nuttall, Studien über die Abschwächung virulenten Bakterien und die erworbene Immunität. Zeitschr. f. Hygiene. Bd. IV. 1888. S. 208 ff.

<sup>3)</sup> Fortschritte der Medicin. No. 5. 1888. Obwohl Hüppé ausdrücklich bemerkt, dass das „experimentum crucis“ am Frosche in Deutschland wenig bekannt sei, so hat Petruschky trotzdem meine betreffende französische Arbeit nicht berücksichtigt und die Angabe Hüppé's unrichtigerweise auf meine viel ältere Abhandlung (dieses Archiv 1884. Bd. 97) bezogen.

<sup>4)</sup> Kritische Bemerkungen zu Metschnikoff's Phagocytenlehre. Zeitschr. f. Hygiene. Bd. IV. S. 351.

Sporen gekeimten Bacillen . . . nach kurzer Zeit zu Grunde gingen“, so weiss ich nicht, woher mein Gegner diese Angabe bezogen hat, denn aus meinen Schriften ist dieselbe nicht zu entnehmen. Sowohl in meinen früheren Versuchen aus dem Jahre 1887, als auch in diesjährigen Experimenten konnte ich noch am 7. und 8. Tage vollkommen lebendige Bakteridien in der vorderen Augenkammer immuner Frösche auffinden. Der Behauptung Bitter's, dass bei diesen Versuchen „die Bacillen wesentlich durch die bakterienfeindlichen Eigenschaften der Körpersäfte zerstört wurden“, fehlt jeder Anhalt, während meine sämmtlichen Wahrnehmungen entschieden gegen eine solche Annahme sprechen. Gegen meine Schilfrohrversuche macht Bitter den Einwand, dass „der Beweis des Lebens der in dem Schilfrohrsäckchen enthaltenen Bacillen nur durch Thierimpfungen erbracht ist“, weshalb „die Möglichkeit nicht auszuschliessen ist, dass auch innerhalb des Säckchens doch wenigstens ein grosser Theil der Bacillen abgestorben war“. Auch diesmal vermisste ich den Grund der Schlussfolgerung Bitter's und kann ihm gegenüber bemerken, dass, um zu langen Fäden auszuwachsen, die Bakteridien doch lebendig sein müssen und dass, wenn ich (a. a. O.) behauptete, dass nach 5 oder 6 Tagen die in den Säckchen eingeschlossenen Milzbrandfäden lebendig waren, dies auf Grund meiner sämmtlichen Wahrnehmungen, unter anderem auch der Farbenreactionen geschah. Uebrigens ist die ganze Sache sehr leicht zu beobachten; nur muss die Kritik nicht bei rein theoretischen Einwänden stehen bleiben, sondern die Experimente eigener vorurtheilsfreier Prüfung unterwerfen, was in Bezug auf die Augenkammer- und Schilfrohrversuche (welche doch meine Hauptargumente bildeten) weder von Flügge, noch von seinen Mitarbeitern geschehen ist. Ich selbst habe die Experimente oftmals mit verschiedenen Modificationen wiederholt und kam dabei stets zu gleichen Resultaten. In meinen ersten Versuchen mit der vorderen Augenkammer benutzte ich sporenlreiche Culturen des Milzbrandvirus, die ich zunächst in Alkohol legte, um vegetative Formen abzutöten, daraufhin in destillirtes Wasser übertrug und dann mit einem feinen Glasrohr durch einen Cornealeinschnitt einbrachte. Am folgenden Tage konnte ich bei sämmtlichen verwendeten Thieren

(immunen Fröschen, Schafen und Kaninchen) eine reichliche Entwicklung von Bakteridien wahrnehmen, womit zugleich eine Exsudatbildung erfolgte. Später vereinfachte ich die Manipulation insofern, als ich in die Augenkammer ein Stück eines sporenhaltigen Seidenfadens einlegte. So wurden 25 Augen inficiert und in verschiedenen Zeitintervallen untersucht<sup>1)</sup>. Bereits  $3\frac{1}{4}$  Stunden nach dem Einlegen konnte ich das erste Auskeimen der Bakteridien beobachten und  $6\frac{1}{2}$  Stunden nach dem Beginn des Experimentes waren schon zahlreiche stäbchenförmige Milzbrandbacillen in der Umgebung des Seidenfadens wahrzunehmen. Dann ging das Wachsthum der Bakteridien zu mehr oder weniger langen Fäden weiter und es bildeten sich dicke seilartige Stränge, so schön, wie sie in den gelungensten Culturen vorkommen. In mit Methylenblau gefärbten<sup>2)</sup> Präparaten erschienen die Milzbrandfäden intensiv blau tingirt, wobei oft an den Enden oder in der Mitte helle Lücken, ebenso wie in gewöhnlichen Culturen, wahrzunehmen waren. 19 und 20 Stunden nach der Operation war bereits eine merkliche Leukocytenansammlung um die Bakteridien in der vorderen Augenkammer zu sehen und mehrere solche Zellen enthielten schon aufgenommene Milzbrandbacillen. Bei Zusatz einer alten Vesuvinlösung wurden herrliche Bilder erhalten. Während die Seidenfasern und mehrere der in Leukocyten eingeschlossenen Bakteridien eine braune Färbung annahmen, blieben sämmtliche freie Milzbrandfäden, sowie ein grosser Theil der eingeschlossenen vollkommen farblos. Mit der Zeit vergrösserte sich die Anzahl eingewanderter Leukocyten um ein Bedeutendes und es konnte der Kampf der Phagocyten mit den Bakteridien auf's Schönste beobachtet werden. Die Bakteridienstränge wurden dabei von allen Seiten von Leukocyten umgeben, welche ganze Fäden oder nur deren Bruchtheile in sich aufnahmen; oft erschienen solche Zellen wie Beeren auf langen Stengeln oder wie Vorti-

<sup>1)</sup> Diese Versuche wurden an Sommerfröschen vorgenommen. Die Temperatur des Zimmers schwankte zwischen  $20^{\circ}$  und  $23^{\circ}$  C.

<sup>2)</sup> Ich muss hier ein für allemal bemerken, dass die trockenen Präparate mit einer verdünnten wässerigen Methylenblaulösung gefärbt wurden, ohne dass die Gläser vorher durch die Flamme gezogen wurden, also nach der Methode von Hess.

cellenkörper auf ihren Stielen. Bei Untersuchung solcher Stadien in mit Methylenblau gefärbten Trockenpräparaten wurde das natürliche Verhältniss gestört: die strängebildenden Fäden gingen auseinander und viele Leukocyten, welche der Oberfläche der Fadenbündel aufsassen, wurden losgetrennt. An solchen Präparaten konnte man aber immerhin viele bakteridienhaltige Leukocyten finden. Es bildeten sich nun dichte Conglomerate von Milzbrandfäden und Leukocyten, welche in einigen Fällen durch die inzwischen grösser gewordene Cornealwunde herausfielen; aber noch am 8. Tage konnten einige ganz normale Bakteridien aufgefunden werden. Um die Lebensfähigkeit der letzteren zu prüfen, nahm ich aus einem Auge, 8 Tage nach dem Beginn des Versuches, einen kleinen Tropfen Exsudat und zertheilte denselben im Humor aqueus eines anderen gesunden Frosches. Es fanden sich in dem Präparat einige in Leukocyten eingeschlossene und mehrere freie Bakteridien, von welchen einige während des Experimentes unter dem Mikroskope verschlungen wurden; von frei gebliebenen wurde nun ein Bakteridium fixirt und  $5\frac{1}{2}$  Stunden lang unter dem Mikroskope beobachtet, wobei ein sehr ergiebiges Wachsthum constatirt werden konnte.

Als ich das Experiment modifizierte, indem ich ein Auge entfernte, das Kammerwasser mit der Pipette aussog, daraufhin ein Stück eines sporenhaltigen Fadens in die vordere Kammer einführe und ein so inficirtes Auge unter die Rückenhaut des Frosches legte, war das Resultat in sämmtlichen 4 Versuchen ein gleiches: es entwickelten sich im ausgeschnittenen Auge ganz normale fadenförmige Bakteridien, welche sich in nichts von denjenigen unterschieden, welche zur Controle in anderen an ihrem normalen Platz befindlichen Augen derselben Frösche sich ausbildeten.

Bei einer solchen Uebereinstimmung der gewonnenen Resultate (selbstverständlich wurden in allen Fällen zur Controle sporenhaltige Seidenfäden unter die Haut der Frösche gelegt, welche indessen kein Bakteridienwachsthum zeigten) konnte ich leicht muthmaassen, dass auch abgeschwächte Milzbrandbakterien, welche überhaupt viel schwieriger auswachsen, einen günstigen Boden im phagocytenarmen Kammerwasser finden. Zur Prüfung dieser Vermuthung habe ich 2 immunen Hammeln und 3 immunen Schafen (die Immunität wurde durch Einimpfung eines starken

Virus controlirt) je ein Auge mit Sporen des ersten Vaccins infizirt und nur in einem Falle, wo gerade eine starke Leukocyten-einwanderung erfolgte, die Bakteridienentwickelung vermisst; in den 4 übrigen konnte ich am folgenden Tage ganz normale fadenförmige Milzbrandbakterien wahrnehmen, welche bei einem Schafe sich besonders massenhaft entwickelt hatten. Bei Fröschen habe ich weniger constante Erfolge gehabt, wenn ich Sporen des ersten Vaccins in die vordere Augenkammer einbrachte, und zwar aus dem Grunde, weil die niedrige Temperatur der Umgebung ein Auswachsen der Sporen verhinderte. Als ich aber 6 Froschaugen mit je einem Tropfen des aus dem Milzsaft einer Maus gewonnenen ersten Vaccins inficirte, bekam ich stets ein positives Resultat: die kurzen eingesäten Stäbchen entwickelten sich in der vorderen Kammer zu mehr oder weniger langen Fäden, welche sich in jeder Beziehung ganz normal verhielten und u. a. auch intensiv blau färbten. Es erfolgte in jedem Falle eine Leukocyten-einwanderung, wobei die Zellen sich der Vaccinefäden bemächtigten und dieselben abtöteten, was am besten durch Vesuvian-reaction constatirt werden konnte.

Angesichts solcher Resultate, welche an lebenden immunen Thieren gewonnen wurden und welche jederzeit leicht nachgemacht werden können, verlieren die mit Humor aqueus im Laboratorium von Prof. Flügge angestellten Experimente die ihnen von ihren Autoren vindicirte Bedeutung vollständig. Unter den gegen die Phagocytentheorie von Flügge, Bitter und Nuttall angeführten zahlreichen Einwänden musste begreiflicherweise eine besonders hervorragende Stelle der bakterientödenden Eigenschaft der phagocytenärmsten Körpersäfte, wie des Humor aqueus, zugeschrieben werden. Und in der That betont Bitter<sup>1)</sup> in seinem kritischen Resumé, dass „Nuttall durch Versuche auf dem erwärmteten Objecttisch zeigen konnte, dass frisches Blut, Humor aqueus, Pericardialflüssigkeit u. s. w. energisch Bakterien zu vernichten im Stande sind, und zwar ohne irgend welche directe Beihülfe von zelligen Elementen“. Wenn gegen die Versuche mit leukocytenhaltigen Säften (Blut, Lymphe) hervorgehoben werden könnte, dass dabei die auch ausserhalb des Organismus thätigen Leukocyten nicht ausgeschlossen wurden, so

<sup>1)</sup> a. a. O. S. 344.

fällt dieser Einwand in Bezug auf den Humor aqueus weg, da im letzteren eine zu geringe Anzahl zelliger Elemente vorhanden ist. Aus der Arbeit Nuttall's<sup>1)</sup> entnehmen wir allerdings, dass die bakteridientötende Fähigkeit des Humor aqueus so gross ist, dass bereits eine Stunde nach dem Beginn des Experiments „im gefärbten Präparat nur noch hochgradigste Degenerationsformen zu finden sind“ und dass in 4 Versuchen sogar „nach 1 Stunde im ungefärbten Präparat die Bacillen nicht mehr wahrzunehmen sind“. Also ein totales Verschwinden der Milzbrandbacillen in so kurzer Zeit und unter dem Einflusse eines fast leukocytenfreien Körpersaftes! Die dieses Phänomen erläuternden Abbildungen (Taf. IV. Fig. 10, 11) zeigen in der That ganz blasser, ruinierte Körper, welche kaum an Bakteridien erinnern. Da, wie es nicht zu bezweifeln ist, nicht nur im lebenden Organismus, sondern auch ausserhalb desselben der Humor aqueus einen ausgezeichneten Nährboden für Bakteridien liefert, selbst wenn das Kammerwasser von ganz immunen Thieren herstammt, so musste man glauben, dass das Wesen, welches einen so bakteridienvernichtenden Humor aqueus liefert, wie derjenige der Nuttall'schen Versuche, ganz besonders unempfänglich gegen Milzbrand sein müsse. Aus der Arbeit des eben genannten Forschers erhellt aber, dass es unrichtig ist anzunehmen, dass in dem Humor aqueus der Kaninchen die Bakteridien bereits nach einem einstündigen Verweilen total verschwinden. Es ist zur Genüge bekannt, dass eine Infection der Kaninchen in die vordere Augenkammer von einem tödtlichen Milzbrande stets gefolgt wird. Um diese allerdings hinreichend constatirte Thatsache durch ein paar Beispiele zu illustrieren, will ich hier die Resultate einiger Versuche mittheilen.

Einem weissen Kaninchen wurde in beide Augen je ein Tröpfchen der Leberemulsion einer milzbrandigen Maus in die vordere Kammer eingespritzt. 1, 2, 4 und 6 Stunden nach der Operation wurden Tropfen des Humor aqueus entnommen und in demselben stets durchaus und in jeder Beziehung normale Milzbrandstäbchen vorgefunden; bereits nach 4 Stunden konnte eine erhebliche Vergrösserung in der Zahl der Bakteridien wahrgenommen werden; 6 Stunden nach der Operation wurden ausser Stäbchen noch längere Fäden beobachtet. Das Kaninchen starb 18 Stunden nach

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Hygiene. Bd. IV. 1888. S. 382, 383.

der Einimpfung an typischem Milzbrand. Ein anderer Versuch an einem grossen schwarzen Kaninchen ergab ein ganz gleiches Resultat, nur mit dem Unterschiede, dass das Thier 27 Stunden nach der Operation an Milzbrand zu Grunde ging. Die in fein ausgezogenen Glaskröpfchen und in hängenden Tropfen gehaltenen Proben des Humor aqueus gaben zum grossen Theil ganz normale Bakteridien; nur einmal fanden sich in einem hängenden Tropfen viele blasse Bacillen, nach einem 2stündigen Verweilen bei 38 bis 45° C., während in der gleichzeitig aus dem inficirten Auge genommenen Probe sich durchaus normale Bakteridien befanden.

Um die Vegetationskraft der Milzbrandbakterien im Kammerwasser näher zu beleuchten, will ich, ein Reihe anderer Experimente übergehend, folgendes Beispiel anführen. Aus dem Auge eines durchaus immunen Hammels, welches zur Cultur des ersten Vaccins diente und eine merkliche Trübung zeigte, wurden in 3 aufeinanderfolgenden Tagen (bei steter Zunahme der Leukozytenmenge) Kammerwasserproben in Capillarröpfchen genommen und mit Sporen des ersten Vaccins inficirt. In allen Fällen entwickelten sich vollkommen normale feine Bakteridienfäden des ersten Vaccins; einige Fäden wurden im Innern von Leukozyten wahrgenommen.

Es erhellt somit, dass die Versuche Nuttall's mit Humor aqueus auf dem Wärmetisch durchaus nicht beweisen, dass das Kammerwasser lebender (immuner sowohl wie empfänglicher) Thiere eine bakteridientödtende Eigenschaft besitzt; vielmehr mussten in seinen Experimenten entweder irgend welche besonders künstliche Bedingungen vorhanden sein oder es hat sich einfach irgend ein Versuchsfehler eingeschlichen, denn ein totales Verschwinden der Bakteridien nach einem einstündigen Verweilen im Humor aqueus der Kaninchen ist unmöglich.

Um die Wirkung der Körpersäfte von der zelligen Elemente (namentlich der Phagocyten) zu trennen, ersann Petruschky<sup>1)</sup> eine andere Methode. Zu diesem Zweck verwendete er in Alkohol macerirte und dann eingetrocknete Darmabschnitte von Fröschen, die nun „mit Culturflüssigkeit gefüllt, sorgfältig wieder durch Zubinden geschlossen und durch eine nicht allzugrosse Wunde unter die Rückenhaut von Fröschen gebracht“ wurden.

<sup>1)</sup> a. a. O. S. 14—17.

Nur in zwei Versuchen vermisste er Leukocyten im Innern solcher Darmsegmente, welche am dritten und vierten Tage nach der Einführung entnommen wurden; sie enthielten „ein sehr dichtes Netzwerk von Bacillenfäden, von denen ein Theil bereits in ganzer Länge Zerbröckelungsscheinungen aufwies (die auch bei Vesuvinfärbung deutlich hervortraten), die Mehrzahl aber doch noch ein homogenes, gesundes Aussehen darbot“. Durch diese Experimente glaubt der Verfasser die Abtötung der Bakteridien durch die Lymphflüssigkeit selbst nachgewiesen zu haben und Baumgarten<sup>1)</sup> (in dessen Laboratorium die betreffende Arbeit gemacht wurde) bemerkt dazu: „Besonders anschaulich demonstrieren dies Verhältniss (d. h. die Abtötung der Bakteridien durch die Lymphflüssigkeit) diejenigen Versuche, in welchen die Milzbrandbacillen, in eine diffusible Membran (doppelt abgebundene Darmeschlinge des Frosches) eingeschlossen, in den Rückenlymphsack eingeführt wurden.“ Nun fehlt aber bei Petruschky der Nachweis, dass die abgestorbenen Bakteridien nicht bereits in der genommenen Culturflüssigkeit vorhanden waren, da doch in jeder Cultur solche degenerierte, ganz blasse Milzbrandfäden, oft in grossen Quantitäten, vorkommen. Jedenfalls konnte Petruschky selbst constatiren, dass die Mehrzahl der in das „Würstchen“ eingeschlossenen Bakteridien ganz normal und vollkommen virulent war, da diejenigen vom vierten Tage eine Maus nach 30 Stunden tödten, während nach seinen eigenen Experimenten mit Milzbrandculturen, welche einfach unter die Rückenhaut eingeführt und somit einem ungehinderten Einflusse der Phagocyten ausgesetzt wurden, „bei directer Ueberimpfung 4tägiger Lymphe vom Frosch auf die Maus eine Infection niemals mehr stattgefunden hatte“ (a. a. O. S. 10). Bei seinen anderen Versuchen mit Darmsegmenten, in welche ein Theil von Leukocyten eingedrungen war, konnte Petruschky schon an den beiden ersten Tagen eine Abschwächung der Virulenz constatiren, am dritten Tage aber hatten die Bakteridien „in mehreren Fällen die Virulenz völlig eingebüßt“ (a. a. O. S. 16). Da diese Experimente in einer Hinsicht (weil keine Prüfung des Vorhandenseins abgestorbener Bakteridien in der verwendeten Cultur vorgenommen war) als unrein, in anderer Hinsicht aber (längeres Erhalten

<sup>1)</sup> Centralblatt f. klinische Medicin. 1888. No. 29. S. 514.

der Virulenz) als den Schlussfolgerungen des Verfassers widersprechende angesehen werden mussten, so unternahm ich deren Wiederholung unter etwas abgeänderten Verhältnissen. Da es mir wahrscheinlich war, dass das so häufige Eindringen von Leukocyten in die Würstchen durch schlechtes Zubinden der trockenen Darmsegmente bedingt war, legte ich die letzteren nach dem Trocknen in kochendes Wasser, wobei sie erweicht und zugleich nochmals sterilisiert wurden. Dann brachte ich, anstatt einer Nährmaterial enthaltenden Cultur, in jedes Würstchen die Hälfte eines sporenhaltigen Seidenfadens ein. Auf diese Weise wurden vier Frösche inficirt, wobei jedem Frosche die andere Hälfte desselben Seidenfadens direct unter die Rückenhaut zur Controle eingelegt wurde. Die Temperatur des Zimmers schwankte zwischen 20° und 22° C. In den Würstchen, welche 15½, 47 Stunden und am vierten Tage nach der Operation untersucht wurden, fanden sich äusserst zahlreiche, zum Theil stäbchenförmige, zum Theil zu langen Fäden ausgezogene Bakteridien, welche sowohl an frischen, wie an mit Methylenblau gefärbten Trockenpräparaten sich durchaus normal verhielten. In späteren Stadien konnte ich an blau gefärbten Bakteridien einige farblose Segmente wahrnehmen, wie sie in jeder Cultur und oft in viel grösserer Anzahl vorhanden sind. Es erfolgte somit, unter dem directen Einflusse der Froschsäfte, ein Auskeimen der Sporen und ein Auswachsen zu langen Fäden, ganz ähnlich wie ich es bei den Versuchen mit Kammerwasser beschrieben habe. Von den Controlfäden konnte ich nur an einem, welcher 15½ Stunden nach der Operation untersucht wurde, ein einziges kurzes Stäbchen wahrnehmen; in sämmtlichen Controlstücken wurden dagegen grosse Leukocytenmassen beobachtet.

Drei anderen Fröschen habe ich mit einem kleinen Tropfen milzbrandigen Meerschweinblutes beladene Darmsegmente unter die Rückenhaut eingebracht, um einen denjenigen von Petruschky ähnlicheren Versuch zu machen. Anstatt einer Cultur wendete ich ein mit Bacillen reich inficirtes Blut an, da in diesem nachweislich keine abgestorbenen Bakteridien vorhanden waren. Die Bacillen wuchsen zu langen Fäden aus und behielten ihre normalen Contouren und Tinctionsfähigkeit bei. Noch am sechsten Tage fand ich in der röthlichen Flüssigkeit aus einem Würstchen eine Menge

langer Milzbrandfäden, welche keine Involutionsformen zeigten, sondern in jeder Hinsicht normal aussahen; an vielen Bakteridien konnte ich bei der Methylenblaufärbung farblose Abschnitte wahrnehmen, welche mit intensiv blauen Segmenten alternirten. Eine mit einem Tropfen dieser bakteridienhaltigen Flüssigkeit des sechsten Tages infizierte Maus starb nach 25 Stunden an typischem Milzbrande mit massenhafter Bakterienentwicklung. Der letzte Frosch wurde am siebenten Tage todt gefunden; das Würstchen enthielt ähnliche Milzbrandfäden, wie bei dem sechstätigigen Versuch, nur waren außerdem noch Leukocyten (zum Theil bakteridienhaltige) und eine Menge kleiner fremdartiger Bakterien beigemischt. Ich hielt es nicht für nöthig eine grössere Anzahl derartiger Experimente anzustellen, denn aus den obigen ging schon zur Evidenz hervor, dass, bei richtiger Versuchsanordnung und Anwendung der nothwendigen Controle, die Ergebnisse sämmtlich mit den Resultaten der Schilfrohr- und Kammerwasserversuche übereinstimmten und den Schlussfolgerungen von Petruschky und Baumgarten direct widersprachen. Es schien mir viel wichtiger, solche Membranen, wie die Darmwandung oder das Schilfrohrmark, ganz zu vermeiden, denn es liesse sich denken, dass sie möglicherweise zu fest seien, um einem etwaiigen bakterientödenden Fermente den Durchgang zu gestatten. Auch gegen die Augenkammerversuche hätte man einwenden können, dass nicht alle Bestandtheile des Blutserums in den Humor aqueus übergehen; wenn derselbe nur Spuren von Eiweiss enthält, so wird er möglicherweise ebenfalls nur Spuren oder auch gar kein hypothetisches bakterientödendes flüssiges Ferment enthalten. Ich wählte daher das denkbar einfachste Mittel und wickelte sporenhaltige Seidenfäden in kleine Stücke sterilisierten schwedischen Fliesspapiers ein, und zwar so, dass auf einer Seite das kleine Packetchen nur aus einer oder zwei Schichten Papier bestand. Wie in den vorigen Versuchen, legte ich eine Hälfte des Seidenfadens in das Packet, während die andere Hälfte direct unter die Rückenhaut desselben Frosches eingebracht wurde. Die Zimmertemperatur schwankte von  $17^{\circ}$  auf  $22^{\circ}$  C. Von 15 auf diese Weise infizirten Fröschen wurde der erste 6 Stunden nach der Operation untersucht. Auf dem Controlfaden konnte ich viele ausgekeimte Milzbrandsporen und nur ovale Bakteridien

wahrnehmen; stäbchenförmige Bacillen waren keine vorhanden. Zu gleicher Zeit fand ich schon eine Anzahl Leukocyten, welche dem Seidenfaden aufsassen. Im Papierpacketchen, welches ebenfalls 6 Stunden unter der Froschhaut gelegen hatte, befanden sich zahlreiche ausgekeimte und nicht wenige stäbchenförmige Bakteridien, dagegen keine Leukocyten. In weiteren Stadien war auf den Controlfäden ein allmählicher Untergang kurzer Bakteridien, welcher gleichen Schritt mit einer Zunahme in der Zahl der Leukocyten hielte, wahrzunehmen, so dass nach 24 Stunden gewöhnlich keine Bakteridien mehr aufgefunden werden konnten. An gefärbten Trockenpräparaten waren in Leukocyten haufenweise eingeschlossene, ganz kurze Bakteridien, oft neben Milzbrandsporen, zu sehen; einige Kurzstäbchen konnten dabei auch frei gefunden werden. Die Erscheinungen an Seidenfäden, welche in Papierpacketchen unter die Froschhaut eingeführt wurden, zeigten diametral entgegengesetzte Verhältnisse. Die ausgekeimten Bakteridien wuchsen zu Bacillen, dann zu geraden oder gewundenen Fäden aus, welche oft ganze Knäuel bildeten. Bei Untersuchung frischer Präparate erschienen sie in jeder Beziehung durchaus normal; in gefärbten Trockenpräparaten zeigten sie oft farblose Lücken, welche durch intensiv blaue Zwischenglieder getrennt waren; recht viele waren indessen gleichmässig blau gefärbt. Dieser allgemeinen Beschreibung lasse ich ein Versuchsprotocoll folgen:

„Versuch 26. Unter die Rückenhaut von zwei Fröschen wurden Packetchen aus Fliesspapier, welche mehrmals abgekocht waren, eingebracht. In jedes Packetchen wurde je ein Stück Seidenfaden mit Sporen von Milzbrandvirus eingelegt. Die anderen Hälften der Fäden wurden direct unter die Haut gesteckt. Die Frösche wurden vor dem Experiment mit Sublimat (1/1000) abgewaschen; die Wunde mit Collodium übergossen. — 24 Stunden nach der Operation wurde ein Frosch untersucht. Um den Controlfaden eine Menge von Leukocyten und viele Fibrinfäden; Bakteridien keine vorhanden. Im Packetchen um den Seidenfaden viele ausgezeichnete Stäbchen und kurze Fäden (weder Leukocyten noch Saprophyten vorhanden). In mit Methylenblau gefärbten Trockenpräparaten färbt sich die Mehrzahl der Bakteridien intensiv blau; einzelne blasse Segmente nicht selten. Saprophyten lassen sich nicht auffinden. — 44 Stunden nach dem Beginn des Versuches wurde ein anderer Frosch untersucht. Um den Controlfaden Leukocyten und Fibrin, dagegen keine Bakteridien. Im Paketchen ein Tropfen klarer Flüssigkeit (Leukocyten nicht eingedrungen). Um den Seidenfaden befinden sich ausgezeichnete entwickelte Bakteridien, zum Theil in Form mehr oder weniger

langer Fäden, zum Theil in Gestalt von Stäbchen. Farblose Segmente (bei der Methylenblaufärbung) sind sehr selten, die ganze Gruppe der Bakteridien ist in jeder Beziehung durchaus normal. Saprophyten sind keine vorhanden. Zimmertemperatur 17° C.“

Am dritten Tage, manchmal auch schon früher, gelangen in das Innere des Packetchens Leukocyten, welche sich zum Theil der Bakteridien bemächtigen, obwohl der grössere Theil der letzteren frei bleibt. In einigen Versuchen konnte, trotz aller angewandten Mittel, die Verunreinigung mit Saprophyten nicht vermieden werden. Indessen gelingt doch bei sauberer Arbeit die grössere Anzahl der Experimente vollkommen und man bekommt eine ergebige Bakteridienentwicklung in Papierpacketen, welche mit Froschlympe befeuchtet sind und von deren zelligen Bestandtheilen nur durch eine dünne Schicht durchnässten Papiers getrennt bleiben. Die analogen Versuche, wo anstatt sporenhaltiger Seidenfäden kleine Tropfen milzbrandigen Meerschweinblutes in Papierpackete eingeführt wurden, ergaben gleiches Resultat.

Bei der Beschreibung obiger Versuche habe ich bereits mehrmals hervorgehoben, dass an freien, unter die Rückenhaut eingeführten Seidenfäden ein Bakteridienauskeimen erfolgt, welches indessen nur zur Bildung von Kurzstäbchen führt. Es ist dies eine Erscheinung, welche ich in meiner oben citirten Arbeit in den Annales de l'Institut hervorgehoben habe, wo ich zugleich bemerkte, dass die Auskeimung nur dann erfolgte, wenn die Milzbrandsporen auf Seidenfäden eingeführt wurden; wenn sie dagegen mit destillirtem Wasser oder Bouillon unter die Froschhaut eingespritzt wurden, blieb das Auswachsen aus und die Sporen wurden bald von Leukocyten aufgefressen. 3 Tage nach dem Einspritzen konnte ich bei der üblichen Tuberkelbacillenfärbung von Trockenpräparaten der Froschlympe (Anilinfuchsin, Methylenblau) noch viele rothen Sporen und eine geringere Quantität blauer im Inneren der Leukocyten auffinden.

Es folgt aus sämmtlichen beigebrachten Angaben, dass schon ein geringer Schutz der Milzbrandsporen gegen Leukocyten genügt, um die ersten zum Auskeimen zu bringen. Je schlechter dieser Schutz ist, desto schneller hört das Wachsthum der Bakteridien auf: am schnellsten wird die Bakteridienentwicklung gehemmt beim directen Einführen der Seidenfäden; weniger schnell

beim vorherigen Einlegen in Packete aus Fliesspapier, welche früher oder später von Leukocyten durchdrungen werden. Es muss hier noch daran erinnert werden, dass Hess<sup>1)</sup>), in Folge seiner ausführlichen und mannichfaltigen Untersuchungen, zu dem Resultat gelangte, dass das Bakteridienwachsthum bei immunen Thieren durch Phagocyten und nicht durch Körpersäfte aufgehoben wird und dass beim Ausschluss der Leukocyten „im Blut die Bacillen rasch auswachsen; selbst in unmittelbarer Nähe des Leukocytenwalls sah Hess häufig die langausgewachsenen Fäden sich hinziehen“. Bei seinen reichhaltigen Studien an *Aspergillus* constatirte Ribbert<sup>2)</sup>), „dass die vordere Augenkammer an sich ein guter Boden für die Entwicklung der Sporen von *Aspergillus flavescens* ist, dass diese überall da Sprossen und Fäden bilden, wo sie ganz oder nahezu frei liegen, dass sie dagegen nur zu einem kümmerlichen Wachsthum gelangen, wo sie, wie auf der Iris, allseitig und schnell von einem dichten Mantel von Leukocyten umhüllt werden“.

Auf welche Weise lassen sich nun die bei Isolirung der Körpersäfte von Phagocyten gewonnenen Ergebnisse mit den Resultaten der Forscher vereinbaren, welche, wie Bitter, Nuttall und Petruschky, zum grossen Theil, wenn nicht ausschliesslich unter Umständen arbeiteten, wo beiderlei Bestandtheile mit einander innig vermischt waren? Gegen die Versuchsanordnung von Nuttall<sup>3)</sup>), welcher Fröschen Stücke milzbrandiger Organe unter die Rückenhaut einführte und sie dann herausnahm und daraus Präparate anfertigte (eine Methode, welche zuerst von Rob. Koch und später von mir angewendet wurde und welche ganz brauchbar für Orientirungszwecke ist), lässt sich einwenden, dass dabei leicht eine Verwechselung der Bakteridien, welche in das Exsudat übergeführ wurden, mit solchen stattfinden kann, welche in dem eingelegten Organstück als freie Stäbchen lagen. Nuttall hat es unterlassen, dieses Verhältniss auf Durchschnitten, nach dem Vorgange von Lubarsch<sup>4)</sup>), zu untersuchen; sonst hätte er leicht gesehen, dass zur Zeit, wenn an der Peri-

<sup>1)</sup> Dieses Archiv Bd. 109. S. 381.

<sup>2)</sup> Der Untergang pathogener Schimmelpilze im Körper. Bonn 1887. S. 52.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Hygiene, a. a. O. S. 355.

<sup>4)</sup> Fortschritte der Medicin. 1888. Bd. 6. No. 4. S. 125.

pherie des eingepfpten Organstückes sehr zahlreiche, in Froschleukocyten eingeschlossene Bakteridien liegen, im Inneren des Stückes noch recht viele, von Leukocyten unberührte, freie Stäbchen, welche gar nicht in Rechnung zu ziehen sind, vorkommen. Ein solches Verhältniss habe ich z. B. an einem Stück milzbrandiger Meerschweinleber constatirt, welches 4 Tage unter der Froschhaut gelegen hatte. Petruschky (a. a. O. S. 3) bemerkt ganz richtig: „Organstücke von an Milzbrand verstorbenen Thieren einzuführen, schien weniger rathsam, weil die in ihnen enthaltenen Bacillen der Lymphflüssigkeit sowohl, als den Leukocyten sehr ungleichmässig zugänglich sind, wodurch naturgemäss auch die Gleichmässigkeit und Klarheit der Resultate gestört werden muss.“ Um diesen Uebelstand zu vermeiden, wandte Petruschky zu seinen Versuchen nur Culturflüssigkeiten an, was aber eine andere Fehlerquelle enthält, indem in Culturen beständig abgestorbene und im Absterben begriffene Bakteridien zahlreich vorkommen. Dadurch werden die Versuchsresultate ebenfalls stark gestört, wie ich dies beim Besprechen der Würstchenversuche schon hervorgehoben habe. Dasselbe lässt sich auch auf die Versuche Nuttall's mit Culturflüssigkeiten wiederholen, zumal er selbst sagt: „Bei Untersuchung der zur Impfung verwandten Cultur stellte sich übrigens heraus, dass auch diese sehr reichliche Involutionsformen enthielt“ (a. a. O. S. 367). Man thut am besten, wenn man, statt Organstücke oder Culturen, zu Versuchen ausschliesslich das milzbrandige Blut von Meerschweinchen anwendet, da in demselben gewöhnlich eine Menge ganz gut erhaltener Bacillen vorhanden ist. Man spritzt einige Tropfen eines solchen Blutes unter die Froschhaut ein und gewinnt dann ganz brauchbare Untersuchungsobjecte. Bei der Beobachtung der letzteren muss ebenfalls eine gewisse Controle geübt werden. So gut in vieler Beziehung die gefärbten Trockenpräparate auch sind, so müssen sie doch mit grosser Vorsicht beurtheilt werden. Wie ich in meiner ersten Milzbrandarbeit aus dem Jahre 1884 bereits hervorgehoben habe, platzen bei der Darstellung solcher Präparate viele Leukocyten, und es gehen gerade diejenigen von ihnen am ehesten verloren, welche am meiste Bacillen enthalten. Nuttall (a. a. O. S. 355) und mit ihm Bitter (a. a. O. S. 345) wollen allerdings diese nur zu oft von mir constatirte

Thatsache nicht anerkennen. Der erstere behauptet: „derartig vorsichtig angefertigte Präparate (angestrichene, mit Methylenblau gefärbte Trockenpräparate) schädigen, entgegen den Angaben von Metsch, nach meinen Erfahrungen weder die Bacillen noch die Leukocyten in irgendwie erheblicher Weise in ihren Formverhältnissen“. Nun muss ich dagegen einwenden, dass man in jedem solchen Trockenpräparat eine beliebige Anzahl geplatzter Leukocyten und alle Stadien ihres Zerfalles leicht sehen kann; auch lässt sich dabei das Herausfallen eingeschlossener Bacillen und der Nuclei am schönsten constatiren. Wie häufig solche zerfallenen und missgestalteten Leukocyten in Trockenpräparaten vorkommen, beweisen am besten die eigenen Abbildungen Nuttall's (a. a. O. Taf. IV). Obwohl dieser Forscher für seine wenigen Abbildungen doch wohl die besten Objecte ausgesucht hat, so finden sich fast in jeder seiner Figuren derartige Leukocyten vor. In der Fig. 1 ist unten links ein zerdrückter Leukocyt mit abnorm herausragenden missgestalteten Kernen abgebildet; die Fig. 2 enthält ein mit Bacillen vollgepropftes weisses Blutkörperchen, aus welchem ebenfalls ein Kernabschnitt hervorragt, und daneben ein Bruchstück eines anderen Leukocyten. In Fig. 5 ist ein unkenntlicher körnchenhaltiger, aber kernloser Klumpen, dessen histologische Natur nicht zu erkennen ist, wiedergegeben. Die Fig. 9 enthält mehrere menschliche Leukocyten, von welchen kaum einer normale Gestalt und Structur aufweist, sondern fast alle zerfallene und ganz missgestaltete Klümpchen darstellen. Diese Collection könnte leicht durch die Anführung solcher Bilder vervollständigt werden, wo Bacillen aus dem Leukocyt zum Theil oder ganz herausgefallen sind, denn in Wirklichkeit sind sie nichts weniger als selten in Trockenpräparaten. Petruschky (a. a. O. S. 7) hat auf Bacillenhaufen aufmerksam gemacht, welche frei lagen, aber in einer Anordnung und Zusammensetzung, „wie sie nur die von Leukocyten aufgenommenen Bacillen anzunehmen pflegen“; es ist ihm also aufgefallen, dass nicht nur von Hause aus freie, sondern auch frei gewordene Bakteridien in den Präparaten vorkommen. „Die Leukocyten selbst aber, in denen diese Bacillen gelegen haben mussten, waren verschwunden“, bemerkt Petruschky. Es ist äusserst wahrscheinlich, dass überladene Leukocyten zu Grunde gehen. Dadurch ist ein Theil solcher freien Bacillen

entstanden; ein anderer Theil aber ist durch künstliches Platzen der Leukocyten bei der Präparation frei geworden.

Die andere, von Nuttall benutzte Untersuchungsmethode — die Beobachtung lebender Objecte in einer physiologischen Kochsalzlösung — ist gewiss für manche Zwecke äusserst anwendbar, nur giebt sie keinen richtigen Begriff von der Zahl der aufgenommenen Bacillen, da viele derselben vom lebenden Protoplasma nicht unterschieden werden können, andere dagegen erst nach der Herstellung des Präparates von noch lebenden Leukozyten aufgefressen werden.

Ich kann nicht behaupten, dass es gegenwärtig irgend eine Methode gäbe, welche eine Statistik freier und aufgenommener Bakteridien rechtfertigen könnte. Jedenfalls sind die Methoden Nuttall's dazu gar nicht anwendbar, da unter „freien Bakterien“ bei ihm sowohl ursprünglich freie, als durch natürliches (im Laufe des Zellenkampfes zu Stande gekommenes) und künstliches (bei der Präparation) Platzen der Leukocyten frei gewordene und auch aus dem eingelegten Organstück künstlich befreite Bakteridien zusammengefasst werden. Die Tabellen Nuttall's beweisen am besten, dass seine Statistik der Wirklichkeit unmöglich entsprechen kann. So sehen wir aus ihnen, dass z. B. nach einem 17 tägigen Aufenthalte unter der Froschhaut kein einziger Bacillus aufgenommen wurde und nur freie Bakteridien aufgefunden werden konnten (a. a. O. S. 357. Taf. II. No. 44). Hier haben wir sicherlich einen solchen Fall vor uns, wo bei der äusserst geringen Zahl der Bacillen überhaupt sich nur einige Stäbchen vorsanden, welche aus einer geplatzten Zelle herausgefallen waren. Man denke nur, dass der von Nuttall auf Taf. IV Fig. 2 abgebildete Leukocyt durch natürliche oder künstliche Einflüsse noch etwas mehr geschädigt würde, als es in der Abbildung zu sehen ist, und dass dadurch sämmtliche 13 incorporirte Bacillen frei würden!

Um möglichst genaue Resultate zu erhalten, müssen, neben Trockenpräparaten, auch frische, unter Anwendung einer alten Vesuvinlösung, untersucht werden. Die Leukocyten und lebenden Bakteridien bleiben dabei noch lange Zeit am Leben, während die abgestorbenen sich mehr oder weniger intensiv braun färben. Bitter und Nuttall haben diese Angaben bestätigt, nur glauben

sie, dass die Vesuvinmethode viel gröber sei, als die Färbung der Trockenpräparate mit Methylenblau, weshalb die letztere Methode vorzuziehen wäre. Demgegenüber muss ich betonen, dass das Methylenblau bei solcher Anwendung bekanntlich auch die todtten Bakterien ganz intensiv färbt, wie dies besonders von Lubarsch (a. a. O. S. 126. Anm. 5) hervorgehoben worden ist, dass sie also nicht einmal im Stande ist, die lebendig gewesenen von den früher abgestorbenen Bacillen zu trennen. Auf der andern Seite bleiben bei dieser Methode auch manche Bestandtheile lebender Bakterien farblos, wie (abgesehen von den Sporen) die körnigen Reservestoffe, welche sich oft in grossen Massen ansammeln. Petruschky (a. a. O. S. 8) findet meine Vesuvinmethode unbrauchbar, weil sie lebende sowohl wie abgestorbene Bacillen rothbraun färbt; indessen beruht diese Meinung auf einem Irrthum, da Petruschky (bei Unkenntniss meiner diesbezüglichen Arbeit), anstatt einer alten, schwach wirkenden Lösung, einfach concentrirte Vesuvinlösung brauchte, welche die lebenden Bacillen abtötete und natürlich braun färbte. Es ist eine Inconsequenz seitens Petruschky's, wenn er seine Vesuvinmethode zur Bestimmung der Abtötung der Bakteridien durch Lymphflüssigkeit benutzt (a. a. O. S. 15).

Bei Anwendung milzbrandigen Blutes (welches unter die Rückenhaut der Frösche eingespritzt wurde) und der Vesuvinmethode neben Trockenpräparaten (mit wässrigem Methylenblau gefärbt) konnte ich mich vielmals davon überzeugen, dass bei immunen Fröschen lebende Bakteridien wenige Stunden nach ihrer Einführung von Leukocyten aufgenommen werden und dass schon am 2. Tage nur wenig freie Bacillen übrig bleiben<sup>1)</sup>). Beim Vergleich frischer Vesuvinpräparate mit aus demselben Material gemachten Trockenpräparaten konnte ich stets constatiren, dass

<sup>1)</sup> Ich habe mich einmal der Mühe unterzogen, sämmtliche in einem Trockenpräparat befindliche Bacillen abzuzeichnen, da die von Nuttall benutzte Methode der Zählung eine weitaus ungenügende ist. Da es unmöglich war, alle eingeschlossenen Bakteridien auseinander zu halten, rechnete ich — absichtlich ungerecht — in jedem bacillenhaltigen Leukocyten nur je ein Bakteridium und hielt dazu alle zweifelhaften Bakteridien für freie. Bei Untersuchung des Präparates, welches 21 Stunden nach der Einführung unter die Haut des Frosches gemacht wurde, ergab die Rechnung 71 pCt. eingeschlossener Bacillen.

die letzteren eine weit grössere Quantität freier Bacillen enthielten. Dass die Bakteridien, welche von Froschleukocyten überwunden wurden, nichts weniger als harmlos waren, zeigt die Thatsache, dass mehrere inficierte Sommerfrösche an Milzbrand zu Grunde gingen, bei einer Zimmertemperatur von 21°—23° C. Bei solchen Fröschen konnte man eine auffallend geringe Aufnahme in Leukocyten und ein Auswachsen der Bakteridien zu Fäden beobachten. Wie die ganze Summe der beschriebenen Erscheinungen bestimmt dafür spricht, dass Leukocyten im Stande sind, vollkommen lebenskräftige Bacillen aufzunehmen, so konnte ich mich von dieser Thatsache auch durch directe Beobachtung überzeugen. Bei Untersuchung eines hängenden Tropfens, welcher aus der Augenkammer eines Frosches gewonnen und mit einigen langen Bakteridien aus der Mäuseniere beschickt war, konnte ich deutlich sehen, wie einer von den wenigen, im Humor aqueus befindlichen Leukocyten sich eines schönen Bakteridiums bemächtigte; da das letztere indessen zu lang war und, bei der Armuth an Leukocyten, keine anderen zu Hülfe hinzukamen, so gelangte das freie Ende zu einem auffallenden Wachsthum in die Länge.

Die Untersuchungen an Fröschen unter Umständen, wo die Lymphflüssigkeit von den Leukocyten nicht abgetrennt wurde, bei Erfüllung der nothwendigen Bedingungen, ergab somit das Resultat, welches mit den Versuchen in der Augenkammer, in den Schilfrohrtäschchen, den Darmsegmenten und dem Fliesspapier durchaus übereinstimmte. Die entgegenlautenden Ansichten von Bitter, Nuttall und Petruschky reduciren sich vorzugsweise auf die Nichtbeachtung gerade dieser Bedingungen.

Die Forschungsergebnisse Nuttall's am Wärmethisch und aus den Culturversuchen, so interessant sie an und für sich sein mögen, tragen kaum etwas zur Entscheidung der Frage über das Verhalten der Bakteridien im thierischen Organismus bei. Das Zugrundegehen der Bakteridien in diesen Versuchen congruiert keineswegs mit den Verhältnissen im lebenden Thierkörper; so sehen wir z. B., dass nicht nur der Humor aqueus, sondern auch das Blut eines für Milzbrand so empfänglichen Thieres, wie das Kaninchen, eine deletäre Wirkung auf Bakteridien und zwar in einem viel höheren Grade, als bei immunen Hammeln und beim Hunde ausübt, was doch dem natürlichen Gange der

Dinge diametral entgegengesetzt ist<sup>1)</sup>). Es spielen hier offenbar Erscheinungen eine Rolle, welche mit den Existenzbedingungen der Bakteridien ausserhalb des Organismus speciell verknüpft sind und welche möglicherweise dem Zugrundegehen bei nachträglichem starkem Nachwuchs einiger pathogener Bakterien im Wasser oder der Choleraspirillen im faulenden Medium (nach Gruber) analog sind. Ausserdem sind bei den Blutversuchen Nuttall's die Leukocyten nicht ausgeschlossen, welche, wie es aus seinen eigenen Beobachtungen hervorgeht, auch ausserhalb des Organismus Bakteridien aufnehmen. Die gegenüber der Trockenmethode oben gemachten Bemerkungen lassen sich auch auf die Anwendung derselben auf Studien am Wärmetisch ausdehnen. Es muss noch hinzugefügt werden, dass man bei letzteren oft sehen kann, wie Leukocyten, auf einem Milzbrandfaden angelangt, auf demselben fortkriechen, etwa wie eine Nacktschnecke auf einer Fadenalge, so dass ein Punkt, welcher so eben eingeschlossen war, nunmehr „frei“ wird und vice versa. Die Fig. 9 (Taf. IV) von Nuttall illustriert dieses Verhältniss, soweit dies eben in einem Trockenpräparat möglich ist, und die Erklärung des Verfassers, dass es sich in diesem Fall um eine „starke Degeneration der freien Fäden“ handelte, bleibt zum mindesten unbewiesen, da es durchaus nicht festgestellt ist, dass die blassen Fadenabschnitte nicht einige Zeit vorher von beweglichen Leukocyten umgeben waren. Ich habe zu wiederholten Malen derartige Untersuchungen am hängenden Tropfen vorgenommen, konnte mich aber niemals von dem regelmässigen Auftreten der von Nuttall so stark betonten Degradationserscheinungen überzeugen. Uebrigens habe ich diese Versuche vielleicht nicht lange genug verfolgt, einfach deshalb, weil ihnen für die uns interessirende Hauptfrage bei Weitem nicht die Bedeutung der Untersuchungen am lebenden Thiere bei Isolirung der Körpersäfte zukommt.

<sup>1)</sup> Man vergl. Tab. XII Versuche 1, 2, Tab. XV Vers. 15, 16, welche die bakterientödende Eigenschaft des Kaninchenblutes illustriren, mit Tab. XIV Vers. 11, 13, welche sich auf das Blut immuner Hammel beziehen; ferner consultire man Tab. XVII Vers. 20, 21 und 24, welche sich auf die bakterientödende Kraft vom Humor aqueus des Hundes und der Kaninchen beziehen.

Da die Arbeit Nuttall's als Grundlage für die kritischen Schlussfolgerungen von Bitter und Flügge gedient hat, so kann Alles gegen die erstere erhobene auch auf die letzteren ausgedehnt werden. Wenn ich diese Kritiken ausführlich besprechen wollte, so müsste ich eine ganze Reihe von Argumenten wiederholen, weshalb ich mich nur auf einige Bemerkungen beschränke. Bitter betont besonders den Umstand, „dass von den unter die Froschhaut gebrachten Milzbrandbacillen immer erst ziemlich spät eine bedeutendere Menge in Zellen gefunden wird“ (a. a. O. S. 348); er bezieht sich auf die Beobachtungen Nuttall's, welche eben diese Frage zu entscheiden nicht im Stande sind. Nimmt man statt der Organstücke Meerschweinchenblut oder Emulsionen aus milzbrandigen Organen oder auch gute frische Culturen, so überzeugt man sich ohne Mühe, dass eingeführte Bakteridien bald von Leukocyten aufgenommen werden, ganz ebenso, wie das Nuttall selbst bei Beobachtung lebender Lymphe unter dem Mikroskop gesehen hat (S. 375). Nach Petruschky beginnt „die Aufnahme der Bacillen bereits wenige Stunden nach deren Einführung“ (a. a. O. S. 10), eine Angabe, welche mit der meinigen übereinstimmt und gegen welche sich nur sagen lässt, dass Petruschky Culturen anwendete, welche unter Anderem auch abgeschwächte Bakteridien enthielten. Dass Leukocyten lebende Bacillen aufnehmen, wird jetzt auch von Flügge und seinen Mitarbeitern und auch von Petruschky angenommen, nur glauben sie an eine vorherige Abschwächung durch Flüssigkeiten. Eine intensive Aufnahme der Bakteridien zu einer Zeit, wo sie noch virulent bleiben, ferner auch die oben mitgetheilten und citirten Versuche über die Virulenz der in den „Würstchen“ der Einwirkung der Lymphflüssigkeit ausgesetzten Bakteridien, sprechen gegen eine solche Annahme.

Für die vernichtende Rolle der Körpersäfte des Frosches führt Bitter noch an, dass, wie nicht anzuzweifeln sei, „im Anfange wenigstens nur ein Theil der Bacillen in Zellen liegt“, und dass es nicht einzusehen wäre, warum die freien Bakteridien „nicht anfangen zu wachsen und in den Körper des Thieres einzudringen“ (S. 345). Bei Beobachtung solcher freien Bacillen kann man sowohl Vermehrungsstadien, als auch verlängerte Individuen constatiren. Eine Allgemeininfektion erfolgt aber eben deshalb nicht,

weil ja viele Bakteridien in zunehmender Menge aufgefressen und vernichtet werden, so dass die Vermehrung derselben stets in Schranken gehalten wird; eine geringe Anzahl freier Bakteridien ruft an und für sich noch keine Allgemeinerkrankung hervor, denn nur eine ungehinderte Vermehrung derselben kann dies bewirken.

Prof. Flügge, welcher früher<sup>1)</sup> glaubte, dass die Phagocytenlehre durch die in seinem Laboratorium von Wyssokowitsch gewonnenen Erfahrungen widerlegt sei, da, nach „Controluntersuchungen“ des letztgenannten Forschers, die Leukocyten nicht im Stande waren, Bakterien aufzunehmen, gesteht jetzt<sup>2)</sup> zu, dass eine solche Aufnahme in Wirklichkeit häufig erfolgt, meint aber „auf Grund der Nuttall'schen Versuche“, „dass die Phagocyten vielleicht nur tote Bakterien aufzunehmen im Stande sind“. Nun gesteht aber Nuttall zu, dass meine Vesuvinmethode im Stande ist, wenigstens zu entscheiden, „ob ein Bacillus noch lebenskräftig, oder ob er ganz abgestorben ist“, und folglich, dass die farblosen intracellulären Bacillen im lebenden Zustande aufgenommen wurden. Der Meinung Nuttall's, welche von Bitter und Flügge getheilt wird, dass das Vesuvin ausschliesslich „ganz abgestorbene“ Bakteridien färbt, dagegen die Uebergangsstadien unberührt lässt, widersprechen meine zahlreichen Beobachtungen, welche darthun, dass die braun gefärbten Bakteridien verschiedene Nuancen zeigen, so dass man oft in einem und demselben Leukocyt ganz schwach gefärbte gelbliche Bacillen neben dunkelbraunen vorfindet.

Da Prof. Flügge die Schlussfolgerungen aus den Nuttall'schen Versuchen an Milzbrandbacillen auf „Bakterien“ überhaupt ausdehnt, so muss ich gleich darauf hinweisen, dass auch bei anderen Bakterien, wie ich wiederholt behauptet habe, eine Aufnahme und Vernichtung lebender Bakterien erfolgt. Am besten wird dies durch solche Beispiele illustriert, wie die „Tuberkulose“ immuner Ratten und die mäusesepticämische Keratitis der Kaninchen. Im erstenen Falle werden die Tuberkelbacillen massenhaft von Eiterzellen aufgenommen, und zwar in einem vollvirulenten Zustande, wie es durch Erzeugen der Tuberkulose bei

<sup>1)</sup> Die Mikroorganismen. 1886. S. 522. Man vergl. meine Bemerkungen in diesem Archiv Bd. 107. S. 241.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Hyg. Bd. IV. S. 226.

Kaninchen mit einem, einen Monat alten Eiter solcher immunter Ratten bewiesen wurde. Bei der durch Mäusesepticämiebacillen erzeugten Keratitis der Kaninchen werden die Bacillen, ebenso wie bei Mäusen, von Leukocyten aufgenommen; während sie aber bei den letzteren Thieren die Sieger bleiben, werden sie in der Kaninchenhaut, nach einem langen Kampfe mit Phagocyten, durch Zellen vernichtet, wie es die noch nicht veröffentlichten Untersuchungen von Ol. Metschnikoff dargethan haben. Bei Mäusen, ebenso wie bei Kaninchen, erfolgt die Aufnahme durch Phagocyten, nur sind sie bei den ersteren nicht im Stande, die Bacillen definitiv zu beseitigen, während dies bei den Kaninchen schliesslich doch erfolgt.

Ausser theoretischen Einwänden beruft sich Flügge noch auf eigene Beobachtungen. „Durchmustert man — sagt er (Z. f. H. S. 227) — unbefangen eine Reihe von Präparaten, welche bei verschiedenen Infectionskrankheiten das gegenseitige Verhalten der Phagocyten und der Bakterien zur Ansicht bringen, so erscheinen die Phagocyten entweder als Opfer der siegreich vordringenden Bakterien oder sie machen den Eindruck von Grabstätten, die in grösster Menge nach beendetem Kampf und hinter der Kampfslinie auftreten; nicht dagegen imponiren sie als mörderische Vorrichtungen, deren sich der Angegriffene zu seinem Schutze bedient.“ Man wird leicht einsehen können, dass diese ganze Darstellung den Stempel des reinen Subjectivismus („machen den Eindruck“, „imponiren“) trägt, so dass es sehr schwer ist, dagegen zu argumentiren; nur glaube ich, dass z. B. die bacillenvernichtenden Riesenzellen der Ziesel mit einem ganzen Haufen normaler und in verschiedenen Degenerationsstadien befindlicher Tuberkelbacillen wirklich imponiren können.

Mein verehrter Opponent wirft der Phagocytenlehre noch vor, dass dieselbe auf deductivem Wege zuerst entstanden ist, anstatt dass ich „auf inductivem Wege zu dieser Annahme hätte gedrängt werden sollen“ (S. 224). Nun glaube ich, dass Deductionen als Leitfaden in der Wissenschaft stets Nutzen bringen und dass sie nur einer exacten inductiven Controle bedürfen. Dass ich aber stets bemüht war, nach Kräften eine solche zu üben, kann unter Anderem auch der Zwischenfall mit der Bakterienaufnahme durch Leukocyten beweisen. — Gegen die methodologische An-

nahme von Flügge will ich nur an die Geschichte der Milzbrandbacillen erinnern. Auf inductivem Wege ist die Kenntniss derselben in den fünfziger und sogar in den vierziger Jahren mehrmals gewonnen worden. Die Thatsachen blieben aber steril, bis Da vaine auf deductivem Wege die Pasteur'sche Lehre über bakterielle Gährungen auf Milzbrand übertragen hatte. Welche Opposition dieser Gedanke damals hervorrief, ist wohl Jedem genügend bekannt, ebenso wie der definitive Ausgang des Streites.

Bei der Discussion der complicirten und für eine Untersuchungscontrole oft recht schwierigen Phagocytenfrage ist es gewiss sehr vortheilhaft, nicht vor einer Detailaufgabe allein stehen zu bleiben, sondern auch die allgemeineren Gesichtspunkte wie die Vorgänge der intracellulären Verdauung der Wirbellosen, die Zellenreaction gegen Fremdkörper und Infectionerreger bei denselben, sowie die entzündliche Auswanderung bei Wirbelthieren stets im Auge zu behalten, damit das Allgemeine nicht durch das Specielle verdrängt wird. In der Biologie, welche es mit den manichfaltigsten und complicirtesten Einrichtungen zu thun hat, wo jede Regel auf Ausnahmen stösst, ist diese Methode ganz besonders nothwendig. Was wäre z. B. aus dem allgemeinen Grundsätze, dass die Hauptwaffen der Wirbelthiere durch Zähne repräsentirt werden, geworden, wenn man nicht die Gesamtheit der Erscheinungen, sondern nur die speciellen Fälle hätte berücksichtigen und aus dem Vergleich der Bezahlung friedlicher Meerschweinchen mit Schnabel und Klauen von Raubvögeln den Schluss ziehen wollen, dass Zähne im Wirbelthierkampfe keine Rolle spielen? oder wenn man aus dem Beispiele der giftigen Schlangen geschlossen hätte, dass nicht Zähne, sondern Giftdrüsen die Hauptwaffe der Reptilien seien?

Auch in Bezug auf Phagocyten, welche eine uralte und manichfaltig ausgebildete und modifizierte Einrichtung der Thierwelt repräsentiren, müssen analoge Fälle vorkommen. Obwohl die Phagocyten, als mobile und fressende Zellen, welche auf der Lungenoberfläche, auf Schleimhäuten und anderen, dem Eintritt der Krankheitserreger besonders ausgesetzten Punkten vorkommen und welche in die Orte auswandern, wo sich die Infectionsträger ansammeln, und gegen dieselben kämpfen, als Hauptwerkzeuge der thierischen Heilkräfte angesehen werden müssen, so wird

diese allgemeine Regel keineswegs dadurch umgeworfen, dass es Fälle giebt, wo die Infectionssstoffe z. B. durch Magensaft zerstört werden, oder wo die mangelhafte Phagocytenthätigkeit durch anderweitige Momente unterstützt wird. Dass zu letzteren, ausser der Temperaturerhöhung, noch einige andere Hülfeinrichtungen gehören mögen, liegt auf der Hand und darf a priori nicht bestritten werden, obwohl es noch nicht gelungen ist, solche Momente mit Sicherheit zu demonstrieren. Dass zu der Entscheidung aller dieser schwierigen Probleme keine Uebereilung und Uebertreibung begangen werde, dazu gehört eben eine strenge wissenschaftliche Kritik, und was mich selbst anbetrifft, so bin ich meinen Kritikern überhaupt und Prof. Flügge insbesondere äusserst dankbar für ihre gegen die Phagocytenlehre ausgeübte loyale Opposition.

Schliesslich muss ich noch einige Einwände der Königsberger Schule berühren. „Von besonderem Interesse“ ist nach der Meinung von Baumgarten<sup>1)</sup> „das Ergebniss der Versuche (von Petruschky) über das Verhalten der Milzbrandsporen im erwärmtten Frosche.“ Die sporenhaltigen Bakteridien wurden auf 62—63° C. (nach Baumgarten, nur auf 62° C. nach Petruschky, S. 22) 2 Stunden lang erhitzt und daraufhin erwärmten Fröschen injicirt. In Folge dieses Experimentes bei der Aussentemperatur „von etwa 30° C.“ „sterben“ — nach Baumgarten — „die Frösche theilweise an Milzbrand“, während nach Petruschky bei dieser Temperatur „die Frösche nicht nur nicht starben, sondern vielmehr ebenso lebhaft und kräftig waren, wie gar nicht geimpfte“ (S. 23), obwohl eine reichliche Sporenauskeimung erfolgte. Die Sterblichkeit der mit erhitzten Sporen geimpften Frösche begann nach Petruschky erst bei Temperaturen von 35—37° C. Die Hauptsache in dieser Versuchsreihe soll darin bestehen, dass trotz einem Wachsthum von Milzbrandfäden, der Phagocytismus „sehr spärlich ist“ (Petruschky, 24) und die Bakteridien als freie Fäden „verschwinden“, wobei die Degeneration durch die Vesuvinmethode bewiesen wird. Sowohl Baumgarten, wie Petruschky, haben übersehen, dass in diesen Versuchen das lange dauernde Erhitzen auf 62° offenbar eine Abschwächung der Sporen erzeugt hatte und dass dadurch

<sup>1)</sup> Centralbl. f. klin. Med. 1888. S. 515.

sowohl der gute Zustand bei 28—30° C. gehaltener Frösche, wie das von Petruschky hervorgehobene verspätete Wachsthum in Gelatine (a. a. O. S. 22) hervorgerufen wurden. Obwohl bei dieser Temperatur die Phagocytenthätigkeit der kaltblütigen Frösche offenbar stark herabgesetzt war, starben die Thiere doch in der Regel (oder in sämmtlichen Fällen) nicht, da die Bakteridien zu schwach waren, um ihre tödtliche Wirkung in kurzer Zeit zu offenbaren; erst bei einer Aussentemperatur von 35 bis 37° C. vermochten sie dies zu thun. Da die gleichzeitige Abschwächung von Phagocyten und Bakteridien das paradoxe Bild einer Bakteridienvegetation bei ganz munteren Fröschen bewirkten, und da die eigentliche Ursache den Autoren entgangen ist, so haben sie wahrscheinlich die späteren Stadien nur wenig beachtet, was aus der Angabe Petruschky's: „5—6 Tage nach der Injection waren alle Bacillen aus der Flüssigkeit verschwunden“ (S. 23), deutlich hervorgeht, denn einfach „verschwunden“ waren sie gewiss nicht. Die Anwendung des Vesuvins in diesem Versuche spricht nur gegen die Methodik von Petruschky, denn, wenn er einmal anerkannt hat, dass das Vesuvin sämmtliche Bakteridien und Leukocyten gleichmässig färbt (was, wie ich oben gezeigt habe, durch Anwendung concentrirter Lösung bewirkt wurde), so durfte er dasselbe Mittel nicht als Beweis für das Degeneriren oder Abgestorbensein benutzen. Da die Phagocytenthätigkeit bei diesen Experimenten künstlich herabgesetzt wurde, was ein Wachsthum abgeschwächter Bakteridien ermöglichte, so ist es klar, dass von letzteren manche ohne den Einfluss der Leukocyten absterben konnten, genau ebenso, wie das in jeder Culturflüssigkeit beobachtet werden kann. Die Hauptfrage besteht demnach nicht darin, wie jedes einzelne Bakteridium thatsächlich gestorben war, sondern wie es zu Stande kommen konnte, dass diese Organismen, anstatt ungehindert neue Generationen zu liefern (was in den Culturen einen ganzen Monat dauert), binnen wenigen Tagen im Froschkörper gänzlich ausgestorben waren. Diese Bemerkung kann auch für viele andere Fälle gelten, wo im thierischen Körper ein Absterben der Bakterien erfolgt, welches der analogen Erscheinung in Culturen (d. h. bei fortgesetzter Bildung neuer Generationen) gleichzusetzen ist.

In einer anderen Königsberger Dissertation berichtet Hilde-

brandt<sup>1)</sup>) über Versuche mit Einführung grösserer Mengen von Milzbrandculturen in die Luftwege von Kaninchen, wobei die letzteren am Leben blieben, anstatt an Anthrax zu Grunde zu gehen. Der Phagocytismus konnte bei sämmtlichen Versuchen des Verfassers nicht „zur Erklärung des mangelhaften Wachstums und des schnellen Verschwindens der Bakterien und Pilze herangezogen werden“ (S. 31). Demgegenüber sprechen die eigenen Beobachtungen von Hildebrandt, welcher bereits  $\frac{3}{4}$  Stunden nach der Einführung in die Trachea die Bacillen „zu nicht geringem Theil in den Staubzellen“ wiedersand. Muskatblüth<sup>2</sup>), welcher, als er geringere Mengen injicirte, eine allgemeine Milzbrandinfection bei Kaninchen constatirte, konnte in einigen Fällen ebenfalls keinen Milzbrand hervorrufen. In den Staubzellen konnte er bei seinen Versuchen ebenfalls „massenhaft eingelagerte Milzbrandstäbchen“ wahrnehmen, nur gelangte er nicht zu der Ueberzeugung, dass diese Zellen als Phagocyten wirken, da er „keinen Zerfall der Bakterien in ihnen wahrnehmen konnte“. Dr. Muskatblüth hatte die Güte, mir in Odessa seine vortrefflichen Milzbrandpräparate zu demonstrieren, in welchen der Kampf zwischen Bakteridien und Makrophagen in allen Stadien auf's Schönste beobachtet werden konnte. In einigen Staubzellen waren allerlei Degradationserscheinungen der Bacillen wahrzunehmen, während in anderen die Zellen selbst zu Grunde gegangen waren. Diese Präparate bestätigten somit die Schlussfolgerung Buchner's<sup>3)</sup> über die Rolle der Phagocyten bei der Milzbrandinfection durch die Lungen. Bei seinen, auf der bakteriologischen Station in Odessa vorgenommenen Untersuchungen einiger Leprafälle konnte Dr. Muskatblüth besonders anschaulich auch die phagocytäre Rolle der Leprazellen nachweisen, worüber er eigens berichten wird.

<sup>1)</sup> Experimentelle Untersuchungen über das Eindringen pathogener Mikroorganismen u. s. w. Jena 1888.

<sup>2)</sup> Centralblatt für Bakteriologie. 1887. Bd. I. S. 323.

<sup>3)</sup> Arch. f. Hygiene. Bd. VIII. S. 230.