

todesfällen konstant Blutungen im T a w a r a sehen Knoten und im linken Schenkelgebiete fand, glaubt, daß solche Blutungen durch Schädigung der Bündelfasern hemmend auf die Überleitung wirken können. Ich kann mich dem nur anschließen, wenn ich auch bis jetzt über keinen durch klinische Untersuchung gestützten einwandfrei beweisenden Fall von Herzstörung durch solche Blutungen im Reizleitungssystem verfüge.

Jedenfalls sind vereinzelte Zerreißen von Fasern des Reizleitungssystems und damit Störungen der regulären Überleitung möglich. Vielleicht trägt dieser Hinweis auf die Befunde von M ö n c k e b e r g, B e r b l i n g e r und meine eigenen dazu bei, die Kliniker zu veranlassen, auch ihrerseits der Pathogenese dieser Blutungen erhöhtes Interesse zuzuwenden, wieweit dieselben einfach toxischer Natur, wieweit sie auf Vagusreizungen, wieweit sie auf direkter Herzmuskelreizung beruhen, und gleichzeitig die Folgen therapeutischer Eingriffe durch elektrokardiographische Methoden genauer als bisher zu verfolgen.

---

## XV.

### Ergebnisse und Ausblicke der Thermopraecipitinreaktion.

Von

Prof. Dr. Alberto Ascoli,

Direktorstellvertreter des Serotherapeutischen Instituts in Mailand.

(Hierzu 5 Textfiguren)

Die Immunitätsforschungen haben nicht nur für die künstliche Immunisierung gegen die verschiedenen Infektionskrankheiten, sondern auch für die Diagnostik derselben eine große Bedeutung erlangt. Für letztere ist von entscheidender Wichtigkeit die Tatsache, daß sowohl spontan während und nach einer Infektionskrankheit als auch bei immunisierten tierischen Organismen in dem Blute in mehr oder weniger großer Menge spezifische Reaktionskörper auftreten.

So enthalten antibakterielle Immunsera neben Antitoxinen, Bakteriolysinen und Agglutininen auch präzipitierende Immunstoffe. K r a u s sah zuerst in keimfreien Filtraten von Bakterienkulturen (Typhus, Cholera, Pest), die er mit gleichnamigen Immunseris versetzte, spezifische Niederschläge auftreten. Dabei entstanden nach Vermischung des klaren Immunserums mit dem klaren Filtrate der Bakterienkultur zunächst leichte Trübungen, dann feine Flocken, die zu Klümpchen zusammengeballt zu Boden sanken, während die darüberstehende Flüssigkeit sich aufklärte.

Eine allgemeine Bedeutung erlangte die Präzipitation dadurch, daß T s c h i s t o w i t s c h und B o r d e t auch mit Seris von Tieren, die mit Aalserum, Blut und Milch vorbehandelt waren, in den zur Immunisierung dienenden Flüssigkeiten Niederschläge erzeugen konnten. Dieser Befund lehrte, daß die von K r a u s bei

Bakterienimmuneris ermittelte Erscheinung auch bei Immuneris zu Recht bestand, die durch Vorbehandlung der serumliefernden Tiere mit Eiweißstoffen tierischer Herkunft gewonnen waren. Eine weitere Verfolgung dieser Feststellung gab endlich Anregung zur Ausarbeitung der Methode der biologischen Eiweißdifferenzierung (A. Wassermann), des in der gerichtlichen Medizin so bedeutungsvollen Verfahrens zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten (Wassermann und Schütze, Uhlenhuth) sowie der Methode für die Bestimmung der Herkunft gewisser Fleischwaren, namentlich zur Unterscheidung des geringwertigen Pferdefleisches von dem wertvolleren Fleische anderer Schlachttiere (Uhlenhuth, Jess).

Während also der Präzipitationsreaktion als Eiweißreaktion eine große Tragweite zuerkannt werden muß, waren seit der bedeutungsvollen Entdeckung von Kraus bereits 13 Jahre verstrichen, ohne daß die Anstellung der Präzipitationsreaktion mit Bakterienimmuneris, wie sie zuerst von dem Wiener Forscher angegeben worden war, eine durchdringende praktische Verwendung erfahren hätte.

In diesem Sinne müssen die Untersuchungen von uns und Valenti als bahnbrechend bezeichnet werden, indem wir die Präzipitationswirkung als spezifische Eigenschaft einzelner Milzbrandsera erkannten und, nach Überwindung zahlreicher Schwierigkeiten, diesen Umstand für die praktische Milzbranddiagnostik zu verwerten gewußt haben.

Um das uns festgesetzte Ziel zu erreichen, haben wir uns fürs erste von der Spezifität der Reaktion bei Heranziehung der Schichtprobe nach M. Ascoli überzeugt und die Herstellung präzipitierender Milzbrandsera zielbewußt ins Auge gefaßt. Wir suchten ferner das milzbrandige Bakterienprotoplasma, gleichviel ob aus frischem, verfaultem, eingetrocknetem oder konserviertem Material, derartig in Lösung zu bringen, daß wir über tadellose, klare Extrakte verfügten. Endlich gelang es uns, unter Verwertung der Thermoresistenz der präzipitogenen Substanz, die Extraktionsmethode derart zu vereinfachen, daß auch der praktische Tierarzt bei Herstellung des Kochextraktes und unter Anwendung des zum Zweck ersonnenen Anthraxdiagnostikums aus unserer Entdeckung Vorteil ziehen kann.

Nachdem unseren jahrelang anhaltenden Bestrebungen der Ausbau einer für die Praxis geeigneten Methode zur Milzbranddiagnose gelungen war und unsere Reaktion in der Heimat (Roncaglio, Favero, Zibordi, Casalotti, De Gasperi, Granucci, Floris, Negroni, Guerrera, Leoncini, Silva) sowohl wie im Auslande (Bierbaum, Pfeiler, Lebre, Markoff, Schütz, Ruppert, Hobstetter, Profé, Preßler, Flemming, Fiscoeder, Zwick, Maag, Quevado, Szymanowski und Zagaja, Canejo, Osiander, Meyer, Isabolinsky und Patzewitsch, Djoubelieff, Alexeijew, Jármai, Elsaesser und Siebel, Seibold, Deelich, Schmitz) Bestätigung und Beifall gefunden hatte, lag es nahe, deren Anwendung zu verallgemeinern, d. h. auf Grund der Prinzipien, auf denen die Reaktion beruht, den

Nachweis von bakteriellem, präzipitinogenem Protoplasma bei andern Infektionen zu versuchen.

Einen ersten Beweis für die Richtigkeit unserer Voraussetzung sahen wir in den ermutigenden Resultaten, die zuerst wir mittels der Thermopräzipitinmethode bei Rotlauf erzielten und die alsbald Bestätigung fanden (Silva, Iwicki, Zagaja, Isabolinsky und Patzewitsch, Raebiger, Seibold, Deelich, Hecht, Gaus).

Eine weitere Verallgemeinerung erfuhr vor kurzem unser Verfahren durch weitere Verwertung bei der Tuberkulose (Fagioli), bei Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen (Reinhardt, Murschel, Rothacker), bei Rauschbrand (Hecht, Deelich) und Mittelmeerfieber (Viganò), und wir glauben, nicht irre zu gehen, wenn wir annehmen, daß sich der Wirkungskreis der Thermopräzipitine noch mehr und mehr erweitern wird, ähnlich wie sie sich allmählich bei der Diagnostik und Differentialdiagnose der Tierseuchen einen ersten Platz errungen haben.

Für diese Methode, welche, dank der Verwertung zweckentsprechender Immunsera, der Schichtprobe nach M. Ascoli und der richtigen Würdigung des Faktors „Zeit“, die spezifischen Komponenten der Leibessubstanzen der verschiedenen Bakterien zu veranschaulichen vermag, ähnlich wie für den Ausfall photographischer Aufnahmen Wahl geeigneter Platten, Art der Bestrahlung und Bemessung der Lichteinwirkung ausschlaggebend sind, dürfte wohl mit Rücksicht auf die Eigenstellung der in Betracht kommenden thermoresistenten Präzipitinogene der Name „Thermoreaktion“ gerechtfertigt erscheinen.

### **Das präzipitierende Milzbrandserum.**

Die ersten Angaben über die Präzipitation bei Milzbrand stammen von Bail, welcher zwar eine stark präzipitierende Wirkung des Milzbrandserums auf die im Ödem enthaltene Flüssigkeit feststellte, jedoch diese spezifische Präzipitationswirkung nicht von dem Gerinnungsvermögen des Normalserums zu unterscheiden vermochte, ebensowenig wie später Carini, der die Niederschlagsbildung bei Milzbrandserum auf die Agglutination zurückführte. Weiterhin haben Gruber und Futaki hervorgehoben, daß Milzbrandsera mit Milzbrandbazillenextrakten spezifische Präzipitate bilden; keiner dieser Forscher, die das Phänomen als solches beobachtet hatten, hat jedoch aus diesem Umstande praktischen Nutzen zu ziehen gewußt.

Der Grund dafür mag wohl darin gelegen sein, daß die im Handel befindlichen Milzbrandsera nur ganz ausnahmsweise präzipitierendes Vermögen besitzen. Unter 40 von uns daraufhin untersuchten Milzbrandseris (vom Esel, Pferd, Maultier und Schaf) besaßen bloß 9 ein deutliches Präzipitierungsvermögen auf Extrakte aus Milzbrandbazillenkulturen; etwas mehr Glück hatten Schütz und Pfeiler, die unter 21 Serumproben verschiedener Herkunft bei 4 ein außerordentlich starkes, bei weiteren 2 ein mäßiges Präzipitationsvermögen nachweisen konnten.

## a) Herstellung.

Um jederzeit über gut präzipitierende Milzbrandsera verfügen zu können, mußte daher vor allem die systematische Herstellung solcher Sera ins Auge gefaßt werden, eine Aufgabe, an die wir uns unverzüglich heranwagten, die wir aber erst nach langem Umhertasten im Dunkeln und nach Überwindung mannigfaltiger Schwierigkeiten lösen konnten. Es zeigte sich nämlich, daß bei der Präzipitinbildung individuelle Verschiedenheiten obwalten, so daß weder bei Auswahl einer besonderen Tiergattung zur Serumgewinnung, noch bei einer bestimmten Einführungsart der zur Immunisierung dienenden Milzbrandkulturen, noch bei Heranziehung gewisser, spezieller Milzbrandstämme konstante und zuverlässige Resultate erzielt wurden. So lieferte uns z. B. bei unseren ersten Versuchen, trotz eines gleichartigen Vorgehens, die Immunisierung von Pferd, Esel, Kuh und Schaf nur bei ersterem dieser Tiere ein gutes Präzipitin, während in weiteren Untersuchungen bessere Resultate beim Esel zu erzielen waren. Zwar konnten bisweilen auch nach Einspritzung von stark konzentrierten, durch Filtrieren keimfrei gemachten Milzbrandextrakten Präzipitine beobachtet werden, die darauf hinweisen, daß die löslichen Bestandteile der Bazillenleiber als Antigen dienen können, doch waren diese Sera nicht hochwertig genug, um zu diagnostischen Zwecken verwertet werden zu können. Ebenso war das Serum von Kaninchen, die mit hohen Dosen von abgetöteten Milzbrandkeimen schnell immunisiert waren, nur wenig wirksam und außerdem nicht so haltbar wie das von großen Tieren gewonnene.

Wir gelangten nach und nach zur Überzeugung, es liege der Hauptfaktor bei Herstellung des präzipitierenden Serums in den Bazillenleibern selbst, nicht in deren Virulenz. Es dienen demnach zur Herstellung zweckmäßig abgeschwächte bzw. avirulente Keime der Milzbrandgruppe; ein Umstand, der überdies geeignet ist, die Unannehmlichkeiten auszuschalten, die bei Immunisierung der Tiere mit virulenten Bazillen obwalten. Bei Verwendung solcher Stämme gelingt beim Esel die Gewinnung präzipitierender Sera rasch und mit klassischem Verlauf.

In der angeführten Kurve ist der Verlauf der Immunisierung und deren Dauer in Wochen veranschaulicht und der präzipitierende Wert des Serums auf Grund des zeitlichen Auftretens des Präzipitationsringes bei Anstellung der Ringprobe verzeichnet; die Kurve gibt graphisch den Verlauf der Immunisierung bei einem Esel wieder, der nach intravenöser Behandlung in weniger als 7 Wochen ein tadellos präzipitierendes Serum lieferte.

Das Problem der Herstellung des präzipitierenden Milzbrandserums ist später mit bestem Erfolge von Alexejew und in aner kennenswerter Weise von Schütz und Pfeiler, etwas früher von Markoff und unlängst von Maag und Declich aufgegriffen worden.

Alexejew, der auf die Beschaffung großer Mengen präzipitierenden Serums für praktische Zwecke bedacht war, führte die Immunisierung am Pferde aus. In Anlehnung an unsere Angaben benutzte er den schwächsten ihm zur Verfügung stehenden Stamm, den ersten Impfstoff von Lange, von dem er nach unserem Beispiel steigende Mengen intravenös einspritzte. Auf

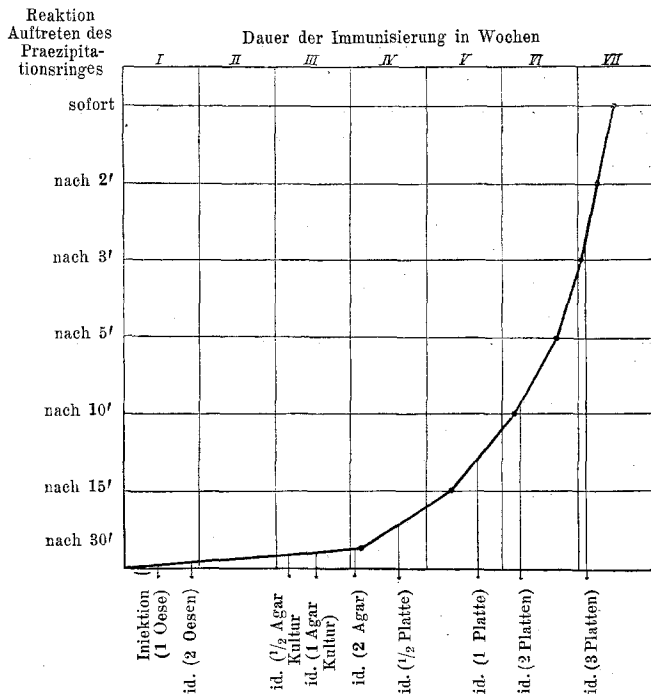


Fig. 1. Das präzipitierende Vermögen des Serums wurde durch das zeitliche Auftreten des Präzipitationsringes bei Anstellung der Ringprobe mit Milzbrandextrakt und dem Serum der verschiedenen im Laufe der Immunisierung entnommenen Blutproben ausgewertet

diese Weise erzielte er in 7 Wochen ein brauchbares, nach weiteren 4 Wochen ein momentan präzipitierendes Serum.

Markoff, der den ersten Beitrag zur Frage lieferte, stellte seine Versuche anfänglich am Pferde, an Ziegen, Hunden und hauptsächlich an Kaninchen an. Da er das Glück hatte, unter 10 ihm von verschiedener Seite zur Verfügung gestellten Milzbrandseris, die sämtlich vom Pferde stammten, drei mit deutlichem Präzipitationsvermögen herauszufinden, glaubte er anfänglich, es eigne sich diese Tierart am besten zur Gewinnung des präzipitierenden Milzbrandserums; ein eigenes Pferdeserum scheint Markoff nicht hergestellt zu haben. Seine Bemühungen, bei Ziegen ein präzipitierendes Serum zu erhalten, scheiterten zum Teil an dem Umstande, daß die meisten dieser Tiere während der Immunisierung zugrunde gingen, während eine mit Ödemflüssigkeit und Milzbrandextrakten vorbehandelte Ziege ein Serum lieferte, das nicht streng spezifisch war. Das bei Hunden gewonnene Serum mußte wegen starker Opaleszenz als zu Präzipitationszwecken ungeeignet ausgeschaltet werden. Es gelang schließlich Markoff, Milzbrand präzipitierende Sera von Kaninchen zu gewinnen, die mit keimfreien Filtraten von Milzbrandbazillen behandelt wurden. Solche Sera hatten zwar anfangs nur schwaches Präzipitationsvermögen; nach 10- bis 15 maliger Behandlung der Tiere gelang es aber doch im Laufe von 8 bis 10 Wochen, ein Präzipitin zu erhalten, das bei der Ringprobe eine sofortige Reaktion auslöste. Für praktische Zwecke dürften jedenfalls Sera von kleinen Versuchstieren, wie vom Kaninchen, weniger in Betracht kommen.

Umfangreicher sind die auf eine praktische Herstellungsweise des präzipitierenden Milzbrandserums bedachten Untersuchungen von Schütz und Pfeiler, die außer bei Kaninchen an Pferden, Eseln, Schafen, weiter bei einer Ziege und einem Rinde vorgenommen wurden.

In Übereinstimmung mit unseren Angaben und jenen von Markoff konnten auch diese

Forscher bestätigen, daß sich vom Kaninchen ein Serum mit präzipitierenden Antikörpern gewinnen läßt. Unter 36 teils subkutan, teils intravenös oder intraperitoneal mit schwach-, mäßig- oder hochvirulenten Keimen und Milzbrandextrakten behandelten Tieren lieferte jedoch nur eines ein starkes, für praktische Zwecke brauchbares präzipitierendes Serum, während die meisten sich für diese Zwecke als ungeeignet erwiesen und aus dem Reste der Tiere nur schwach präzipitierende Sera gewonnen wurden.

Nach den gleichen Grundsätzen suchten diese Forscher präzipitierende Milzbrandsera bei Schafen und Ziegen zu gewinnen, doch zeigte sich die Immunisierung mit abgetöteten Kulturen als erfolglos, während bei Behandlung mit lebenden Keimen von mittlerer bis hoher Virulenz eine Anzahl von Tieren, trotz Behandlung mit spezifischem Heilserum, an Milzbrand eingingen. Viel günstiger lauteten die Versuche beim Esel, bei dem die Vorbehandlung mit größeren Mengen lebender, schwach oder mittelgradig virulenten Milzbrandkulturen, in den meisten Fällen in kurzer Zeit zur Gewinnung eines momentan präzipitierenden Serums führte. Die vorzugsweise Verwendung des Esels vor dem Schafe würde sich nach Schütz und Pfeiler schon aus dem Grunde empfehlen, weil er dem Milzbrand gegenüber viel widerstandsfähiger ist. Außerdem wurde die Herstellung des präzipitierenden Serums noch bei 6 Pferden und bei einem Rinde mit hinreichend guten Resultaten durchgeführt.

Über die Bildung der präzipitierenden Antikörper entscheidet nach Schütz und Pfeiler nicht nur die individuelle Veranlagung des serumliefernden Tieres, sondern auch die besondere Beschaffenheit der für die Vorbehandlung verwendeten Kulturen.

Auch Declich hat zu Studienzwecken die Gewinnung eines Milzbrand präzipitierenden Serums bei Kaninchen angestrebt, jedoch mit negativen Resultaten. Das erzeugte Serum zeigte keine spezifische Präzipitationswirkung, sondern es trat die Ringbildung mit milzbrandigem Material sowohl als mit nicht milzbrandigem in Erscheinung, ein Umstand, der von Declich auf die Herstellungsart des Antigens zurückgeführt wird, da die zur Immunisierung verwendeten Kulturfiltrate eine halbe Stunde im Autoklaven bei 120° C gelassen wurden.

Zum Schlusse sei noch der Versuche Maags Erwägung getan, der sich ebenfalls, jedoch mit negativen Resultaten, um die Herstellung eines präzipitierenden Milzbrandserums bemühte. Die Anzahl der Tiere, über die er verfügte, war nur eine geringe: 2 Esel, 1 Ziege und einige kleine Versuchstiere. Bei der Immunisierung verwendete er abgeschwächte Milzbrandkulturen, die er vornehmlich subkutan einführte. Die Ziege ging schon nach wenigen Einspritzungen ein, bei den übrigen Tieren konnte nach 4 monatlicher Behandlung ein präzipitierendes Serum nicht erzielt werden, worauf Maag seine Versuche einstellte.

#### b) Wertbestimmung.

Um aus der Präzipitationsreaktion bei Milzbrand praktischen Vorteil ziehen zu können, ist es in allererster Linie notwendig, über ein wirksames Serum zu verfügen. Ähnlich wie bei Schutz- und Heilseris bedarf man jedoch auch bei Seris zu diagnostischen Zwecken einer Methode, die über deren Wert Aufschluß erteilt. Zur Titerbestimmung kann jedoch die für Antieißsera geübte Verdünnungsmethode nur bei Innehaltung bestimmter Bedingungen benutzt werden, da die als Ausgangspunkt dienenden Bakterienextrakte je nach dem mehr oder weniger üppigen Wachstum, dem Alter der Kultur, dem Verhältnisse zwischen Milzbrandbakterien und Sporen, der Art und Menge des Extraktionsmittels und der Temperatur eine schwankende Konzentration aufweisen.

Wenn z. B. die Extrakte bei Zimmertemperatur mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt wurden, lag die oberste Grenze für die Ringprobe bei einer Ver-

dünnung der Auszüge von 1 : 200; wurden hingegen stark konzentrierte Extrakte herangezogen, so verschob sich für ein und dasselbe Serum der Grenzwert auf 1 : 5000 bis 1 : 10 000.

Es wurde demnach von einer mathematisch genauen Titerbestimmung füglich Abstand genommen, und es sind für die Präzipitinreaktion ausschließlich solche Sera zugelassen, welche bei Anstellung der Schichtprobe eine sofortige Trübung an der Berührungsfläche zwischen Milzbrandextrakt und Serum bewirken. Die Prüfung des Serums wird mit zwei Extrakten vorgenommen, die unter Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung als Extraktionsflüssigkeit aus einer Reinkultur der Milzbrandbazillen bzw. aus der Milz eines sicher milzbrandkranken Tieres hergestellt werden.

Diese Extrakte, auf deren Herstellungsart und Konzentration wir später zurückkommen, sollen mit dem spezifischen, präzipitierenden Serum sofort die für die Schichtprobe charakteristische, ringförmige Trübung geben, hingegen mit Normalserum der gleichen Tierart  $\frac{1}{4}$  Stunde lang vollkommen klar bleiben. Diese Kontrollproben sind notwendig, weil zu konzentrierte Extrakte gelegentlich auch mit Normalserum oder Immunsereen gegen andere Krankheiten Präzipitationsringe geben können. Außerdem ist eine Probe mit dem Extrakt einer normalen Milz anzustellen, um sich zu vergewissern, daß unter denselben Verhältnissen keine Ringbildung auftritt.

Diese Wertbestimmung, die lediglich auf die praktische Brauchbarkeit des Serums Rücksicht nimmt, dürfte für die praktischen Bedürfnisse genügen und hat sich in der Tat bei den vielen bisher von uns und andern Forschern angestellten Versuchsreihen als brauchbar erwiesen.

Die genauere Wertbemessung, die ja in der Praxis wegfällt, kann zur Einschätzung der Wirksamkeit, zumal bei der Herstellung der präzipitierenden Sera, gute Dienste leisten, da es mittels derselben möglich ist, zu erfahren, welcher Zeitraum zur Blutentnahme am geeignetsten ist bzw. am wievielten Tage nach einer Einspritzung das Serum die größte Menge der präzipitierenden Antikörper enthält.

Wir pflegen weiterhin den Gehalt an Präzipitin in der Art annähernd zu bestimmen, daß wir das zu verausgabende Serum auch mit Verdünnungen unserer Extrakte prüfen. Die Ringbildung tritt gewöhnlich für die Verdünnungen des Kulturextraktes zu 1 : 10 bis 20, auch 1 : 50 noch prompt auf; bei höheren Verdünnungen stellt sie sich immer langsamer ein, bei 1 : 100 bis 200 bleibt sie endlich innerhalb einer Viertelstunde ganz aus. Bei den Verdünnungen des Milzextraktes, welches in der Regel mehr Präzipitinogen enthält, verschieben sich die Grenzen bis um eine Dezimalstelle, wenn das Extrakt, wie später angegeben, aus der Milz eines an spontaner Milzbrandinfektion gefallenem Rindes hergestellt wird.

Schütz und Pfeiler glaubten diese Wertbestimmungsmethode noch durch eine quantitative Bestimmung des Gehaltes an präzipitierenden Antikörpern ergänzen zu müssen. Als Normaleinheit bezeichnen sie jene Menge antigener Substanz, die in einem Extrakt von bestimmter Konzentration enthalten ist, und

als einwertig das Serum, das imstande ist, die bei der Konzentration des Antigens von einer Normaleinheit vorhandene antigene Substanz momentan sichtbar durch Ringbildung zu beeinflussen. Da nun aber gute präzipitierende Milzbrandsera nicht nur die in der Normaleinheit vorhandene Antigenmenge anzuzeigen vermögen, sondern auch Bruchteile derselben, so gehen Schütz und Pfeiler in der Weise vor, daß sie ein Serum, das z. B. das hundertfach verdünnte Antigen noch momentan nachzuweisen vermag, als hundertfaches Serum bezeichnen und dieses als Standardserum für die Einstellung neuer Antigenlösungen heranziehen.

### c) Konservierung und Haltbarkeit.

Die präzipitierende Substanz des Milzbrandserums ist lange haltbar; so fand Granucci, daß eine über 14 Tage in einem warmen Raume aufbewahrte Serumprobe ihr präzipitierendes Vermögen nicht eingebüßt hatte, und ein Gleiches konnten Schütz und Pfeiler bei einem lange Zeit auf Eis gehaltenen verfaulten Serum feststellen. Letztere Forscher konnten sich weiter davon überzeugen, daß die Einwirkung von Schimmelpilzen im nicht konservierten Serum die Präzipitationsfähigkeit nicht zerstört, weshalb nach ihnen von einer Filtration schicklich Abstand genommen werden kann.

Auch mäßige Wärmegrade scheinen die Brauchbarkeit des präzipitierenden Serums nicht merklich zu beeinträchtigen; nach Granucci verträgt das Serum Temperaturen bis zu 56°; bei 70° und darüber verliert es aber sein präzipitierendes Vermögen. Schütz und Pfeiler machten die Beobachtung, daß durch halbstündiges Erhitzen auf 56° die Normalpräzipitine des Serums, die sich in einigen Fällen neben den spezifischen Präzipitinen störend bemerkbar machen, vernichtet wurden. Eine Erwärmung auf 65° bis 70°, die das native und gelöste Eiweiß angreift und zur Gerinnung bringt, hebt nach diesen Forschern die Präzipitationswirkung des Serums auf. Isabolinsky und Patzewitsch erhielten noch positive, obgleich etwas langsamer auftretende Reaktionen mit Serum, das auf 56° erhitzt war, bei einer Erwärmung des Serums auf 60° unterblieb die Reaktion gänzlich.

Bei den von uns hergestellten Seris unterlassen wir in der Regel den Zusatz der bei Schutz- und Heilseren üblichen Konservierungsmittel, Alexejew filtriert seine Sera durch Berkefeld, Schütz hingegen versetzt sein Serum mit 0,5prozentiger wässriger Phenollösung, die er tropfenweise unter ständigem Schütteln zugibt.

Wird das präzipitierende Serum im kühlen dunklen Raume gehalten, so bleibt es viele Monate, auch Jahre lang wirksam. So überzeugten sich z. B. Szymanski und Meyer, daß ihre unter solchen Bedingungen aufbewahrten Serumproben nach 6 Monaten nichts von ihrer Stärke eingebüßt hatten; wir selbst verfügen über Sera, die nach Jahren noch vorzüglich reagieren. Bei nicht geeigneter Aufbewahrung läßt sich eine Verminderung des Wertes wohl schwerlich ganz vermeiden.



Sowohl das steril gewonnene wie das konservierte Serum trüben sich allmählich, und es bildet sich nach einiger Zeit ein Bodensatz. Diesem in der Tat etwas störenden Übelstande, der auch den sterilen Antieiweißseris anhaftet, wird entgegengesteuert, indem man das Serum vor dem Gebrauch absetzen läßt oder die Trübungen durch Zentrifugieren beseitigt. Das serotherapeutische Institut in Mailand liefert auf Verlangen auch präzipitierende Sera, die sich nicht trüben; bloß ist die Ringbildung bei denselben etwas verzögert.

### **Spezifität der Thermoreaktion.**

Normale Sera oder Sera von Tieren, die gegen andere Infektionen (Tetanus, Diphtherie, Ruhr, Typhus, Kolibakterien, Pneumokokken, Streptokokken) immunisiert waren, zeigten bei tadelloser Versuchstechnik mit unseren Milzbrandkulturextrakten keine spezifische Präzipitationserscheinung. Schon zu Anfang unserer Untersuchungen machten wir jedoch darauf aufmerksam, daß die präzipitierende Wirkung des Milzbrandserums nicht absolut spezifisch ist. Es fiel zwar die Schichtprobe bei unseren Kontrollversuchen mit den in der unten beschriebenen Weise hergestellten Extrakten von Cholera-, Dysenterie-, Mesentericus-, Staphylo- und Streptokokken sowie Rauschbrandkulturen vollkommen negativ aus; ebenso zeigte sie keine Reaktion gegenüber den gewöhnlichen Extrakten aus frischen oder faulig veränderten Organen von gesunden oder an verschiedenen Infektionen und Intoxikationen verendeten Tieren, dagegen kam es zu mehr oder weniger deutlicher Reaktion, wenn Extrakte aus den sogenannten Pseudomilzbrandbazillen mit dem Serum unterschichtet wurden. Pseudomilzbrandbazillen und Anthrakoidesarten besitzen in der Tat eine große Affinität zum echten Milzbrandkeime, so daß eine Unterscheidung derselben, nach *V a l e n t i*, weder mittels der metachromatischen Färbung noch auf Grund des Verhaltens bei der Präzipitationsreaktion möglich ist. Aus unseren Untersuchungen schöpften wir trotzdem sogleich die Überzeugung, daß vom praktischen und diagnostischen Standpunkte der Wert der Reaktion dadurch nicht beeinträchtigt wurde, insofern dieselbe an Auszügen von Organen nicht milzbrandiger Tiere in der Regel negativ, an solchen aus Milzbrandmaterial fast durchweg positiv ausfiel. Wir hoben auch hervor, daß in zweifelhaften Fällen durch entsprechende Verdünnung der Extrakte Abhilfe geschafft werden konnte, zumal von den Keimen mit durch Milzbrandserum spezifisch fällbarer Leibessubstanz keiner eine solche Vermehrung in den Organen aufweist wie der Milzbrandbazillus.

Diese unsere Annahme über die Spezifität unserer Reaktion konnte bei den zahlreichen Nachprüfungen seitens der verschiedensten Forscher voll und ganz bestätigt werden.

Zur Kontrolle der Spezifität des Serums wurden anstatt des Milzbrandextraktes Extrakte der verschiedensten Art aus Kulturen und Organen angewandt: so z. B. Extrakte von Rotlauf (*Schütz, Pfeiler, Lebre, Flemming* usw.), Rotz, Tuberkulose, Typhus, Paratyphus A und B; Schweinepest, Koli,

Ruhr, Druse, Brustseuche (Bierbaum, Roncaglio, Schütz und Pfeiler usw.), Nagana (Favero), Maul- und Klauenseuche, Rauschbrand (Roncaglio), Schlafkrankheit (Lebre), Piroplasmose, Pasteurella (Maag), Wut, Syphilis, Scharlach (Isabolinsky und Patzewitsch) usw.; durchweg mit negativen Ergebnissen.

Andererseits wurden versuchsweise auch Extrakte der verschiedensten teils frischen, teils verfaulten normalen Organe von Mäusen, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden, Schafen, Rindern und Pferden für die Anstellung der Reaktion verwandt, ohne daß von irgendeiner Seite über Fehlresultate berichtet worden wäre.

In gleicher Weise modifizierten nach unserem Beispiel Schütz und Pfeiler die Versuchsanordnung, indem sie zur Kontrolle an Stelle des präzipitierenden Milzbrandserums eine Anzahl von Normal- und Immunseris (Rotlauf-, Brustseuchestreptokokken-, Pasteurella-, Druse-, Paratyphus B-, Rauschbrand- und andere Sera) auf ihr Verhalten gegenüber Reinkulturextrakten der Milzbrandbazillen und Milzbrandorganextrakten prüften, wobei sie das momentane Auftreten der Reaktion nur bei Milzbrandseren wahrnehmen konnten. Nur ausnahmsweise zeigten einzelne Normal- und Immunsera nach kürzerer oder längerer Berührung sowohl mit den Extrakten als auch mit Karbolkoehsalzlösung eine leichte Ringbildung, die folgerichtig als nicht spezifische Erscheinung aufgefaßt wurde. Dieser Umstand veranlaßte die genannten Forscher, unserer Forderung beizutreten, daß zur Ausführung der Reaktion zu diagnostischen Zwecken nur solche Sera zuzulassen seien, die momentan präzipitierend wirken.

Wie schon erwähnt, erfährt die Spezifität der Präzipitation bei Milzbrand dadurch eine theoretische Einschränkung, daß sie unter Umständen auch mit Pseudomilzbrandbazillen auftreten kann, also mit Bazillen, die den Milzbrandkeimen zwar verwandtschaftlich nahe stehen, aber eine Milzbrandinfektion selbst nicht auszulösen vermögen. Der von uns in unserer ausführlichen Mitteilung schon verneinten Frage, ob Pseudomilzbrandbazillen den praktischen Wert unserer Methode schmälern können, ist, auf unsere Veranlassung, de Gasperi auf Grund ausführlicher experimenteller Belege nähergetreten.

Es hat dieser Forscher in einer größeren Reihe von Versuchen nachgeprüft, ob erstens unter experimentellen, übertrieben zu nennenden Verhältnissen, wie sie in der Praxis nicht vorliegen, die präzipitinogenen Substanzen des Pseudomilzbrandbazillus und des *Bacillus anthracoides* den Ausfall der Reaktion in positivem Sinne beeinflussen könnten und ob dieses zweitens unter Verhältnissen, die den in der Natur vorkommenden ähnlich sind, gleichfalls der Fall wäre. Die Versuche de Gasperis zeigen, daß zwar im ersten Falle die Reaktion positiv sein kann, daß sie hingegen bei Kaninchen, die nach Reizung der Darmschleimhaut mit Kulturen der genannten Bakterien gefüttert wurden und in deren Milz die Keime zum Teil kulturell nachzuweisen waren, negativ ausfällt.

Ähnliche Versuche wurden in gleicher Absicht später auch von Schütz und Pfeiler angestellt und dabei bestätigt, daß Extrakte aus Organen, die unter Nachahmung natürlicher Verhältnisse mit Pseudomilzbrandbazillen infiziert wurden, die Reaktion überhaupt nicht mehr oder nur mit einem außerordentlich stark präzipitierenden Serum innerhalb mehrerer Minuten geben. Auf Grund dieser Beobachtung treten Schütz und Pfeiler der schon von Roncaglio geäußerten Ansicht bei, daß es sich empfehlen dürfte, zwar momentan wirkende, aber nicht zu hochwertige Sera für die Präzipitationsdiagnose des Milzbrandes zu benutzen.

Die Frage, inwieweit Anthrakoidesarten, anthraxhaltige Erde oder im Darmtraktus von nicht an Milzbrand eingegangenen Tieren vorhandene Milzbrandkeime die Spezifität der Reaktion zu beeinträchtigen vermögen, ist von Meyer experimentell geprüft und genau erörtert worden.

Er ließ zum Zwecke in einer ersten Versuchsreihe normale Organe in anthraxhaltiger Erde faulen und stellte nach einigen Wochen mit Material aus den verschiedenen Schichten die Ringprobe an. Die Reaktionen verliefen in den Fällen, bei denen es sich um Teile aus dem Innern der Organstücke handelte, vollständig negativ; es trat auch in der Mehrzahl der äußeren Proben keine Reaktion auf, während in wenigen Fällen sich die Ringbildung bemerkbar machte, jedoch nicht sofort nach der Übersichtung, sondern erst zwischen 15 bis 45 Minuten. In einer zweiten Versuchsreihe ließ Meyer unter ähnlichen Versuchsbedingungen das zu untersuchende Material in mit milzbrandähnlichen Keimen infizierter Erde faulen, mit dem Ergebnis, daß eine Ringbildung bei Anstellung der Schichtprobe in der großen Mehrzahl der Fälle ausblieb, daß aber dieselbe in Ausnahmefällen zum Ausdruck kam, jedoch erst nach 45 bis 60 Minuten, also zu einer Zeit, in der die Reaktion einen spezifischen Charakter nicht mehr beanspruchen kann. In einer letzten Versuchsreihe wurde den Versuchstieren eine geringe Menge Anthraxteig verfüttert, sie wurden hierauf getötet und erst bei vorangeschrittener Fäulnis der Organe die Präzipitationsreaktion angestellt; die Ergebnisse fielen insgesamt negativ aus mit Ausnahme eines Falles, in dem der Kadaver mit eröffneter Bauchhöhle 28 Tage faulte und bei dem einige Organe, wie z. B. die Niere, positiv reagierten. Im großen ganzen dürfte somit auch unter solchen Bedingungen das Präzipitationsverfahren genug spezifisch sein, nur müßte man in derartigen Fällen vorsichtiger zu Werke gehen, alle nötigen Kontrollversuche anstellen und die Methode der Extraktverdünnung heranziehen.

Im allgemeinen kann, abgesehen von ganz wenigen Ausnahmefällen, die erst durch entsprechende Verdünnung der Extrakte einer richtigen Beurteilung zugänglich werden, die Reaktion als genügend spezifisch gelten, um in der Praxis brauchbare Resultate zu zeitigen.

Wie jede biologische Untersuchung, so verlangt natürlich jedoch auch die Präzipitationsreaktion eine gute technische Schulung und eine genaue Einhaltung der Versuchsanordnung.

### **Das verdächtige Material.**

Was die Auswahl des verdächtigen Materials betrifft, so stellt das Verfahren nur ganz bescheidene Ansprüche, indem es zwar die Milz als klassisches Untersuchungsmaterial wegen ihres Reichtums an Bazillen bevorzugt, sich jedoch in der Not mit einem haselnußgroßen Stückchen aus einem beliebigen Organ begnügt.

So wurden von uns und andern Forschern positive Reaktionen mit der Milz, Lunge, Leber, Niere, Nebenniere, mit Darm, Herz, Knochenmark, Lymphdrüsen usw. erreicht; auch die Ödemflüssigkeit, Blut, Ergüsse, Haut- und Muskelstückchen wurden mit positivem Erfolge verwendet.

Die Frage über die mehr oder weniger große Tauglichkeit des einen oder andern Organs zur Entnahme des Prüfungsmaterials ist vor allem von Roncaglio, Osiander, Isabolinsky und Patzewitsch erörtert worden: nach ersterem eignet sich am besten die Milz; ihr folgen in abstufender Reihe das sulzige Ödem, die Haut und das Unterhautzellgewebe, insofern sie von der Eingangspforte des Keimes entnommen werden; hierauf kommen Herz, Blut, Muskeln, Leber, Niere und Hirnsubstanz. Isabolinsky und Patzewitsch erhalten die deutlichsten Resultate mit der Milz und der Ödemflüssigkeit; sie bezeichnen aber auch Material aus Leber, Niere, Blut, Lymphe, Herz, Haut und Lunge als gut brauchbar. Osiander hebt hervor, daß mit Material aus Milz, Leber, Herz und Niere der Präzipitationsring rasch und deutlich, mit Material aus Lunge und Muskeln erst nach einigen Minuten auftritt; es will ihm scheinen, es werde in letzterem Falle die Reaktion anfänglich durch die Opaleszenz verdeckt, die er bei

Lungen und Muskelextrakten nie ganz beseitigen konnte. Daß die Reaktion mit Muskelextrakt etwas später auftritt, ist auch von Favero hervorgehoben worden. Ein undeutliches Resultat will Lebre mit Material aus der Mamdrüse erhalten haben; Alexejew redet der Verwendung von Lungenextrakten sehr das Wort.

Die Thermoreaktion vermag also den vielfachen Erfahrungen zufolge die Anwesenheit milzbrandigen Protoplasmas in den verschiedensten Organen anzuzeigen, und zwar, wie wir noch sehen werden, nicht nur, wenn dieselben in frischem, sondern auch, wenn sie in verfaultem oder konserviertem Zustande zur Untersuchung gelangen.

#### Verhalten der präzipitinogenen Substanz.

Der praktische Nutzen der Thermoreaktion bei Milzbrand, dank welchem sie sich neben dem bakteriologischen Nachweis eingebürgert hat, hängt innig mit dem physikalisch-chemischen Verhalten des Präzipitinogens zusammen, d. h. der im Milzbrandprotoplasma enthaltenen Substanz, welche mit dem Präzipitin des spezifischen Serums spezifisch zu reagieren vermag.

##### a) Verhalten der Fäulnis gegenüber.

Schon bei unseren ersten Versuchen konnte ermittelt werden, daß der Verwesungsprozeß das Präzipitinogen keineswegs zerstört, sondern daß die Reaktion auch mit Extrakten aus Organen gelingt, die erhebliche Zeit der Fäulnis ausgesetzt waren. In der Tat beeinträchtigt die Fäulnis, welche bei der bakteriologischen Prüfung so störend wirkt, die Präzipitinreaktion nicht; es scheint vielmehr aus dem einstimmigen Urteil der Forscher, die sich um diesbezügliche Nachprüfungen verdient gemacht haben, zu erhellen, daß die Nachweisbarkeit des Milzbrandes in faulen Organen eine unbegrenzte ist. So erhielten wir selbst positive Reaktionen mit einer 16 Monate der Fäulnis überlassenen milzbrandigen Milz, während sich die längste Erfahrung von Schütz und Pfeiler auf Organteile erstreckt, die 550 Tage gefault hatten. Daß die Methode mit mehr oder weniger lange Zeit der Verwesung anheimgefallenen Organen tadellos arbeite, bestätigen auch Zwick, Granucci, Bierbaum, Meyer, Lebre, Maag, Oslander, Deelich u. a.; nur Isabolinsky und Patzewitsch wollen beobachtet haben, daß nach 30- bis 40tägigem Faulen des Materials die Ringbildung etwas schwächer zum Ausdruck kam.

Bei der praktischen Wichtigkeit einer sicheren Anthraxdiagnose im Hinblick auf die Seuchentilgung und die Entschädigungsfrage verdient dieser Umstand die größte Würdigung, da durch denselben der Prozentsatz des sicheren Nachweises um ein bedeutendes gesteigert werden kann.

##### b) Thermoresistenz.

Im Verlaufe von Untersuchungen, die mehr zur Ergründung des Wesens des spezifischen Präzipitinogens angestellt wurden, konnten wir gewisse Eigenschaften

desselben ermitteln, welche in der Feststellung einer höchst beachtenswerten Widerstandsfähigkeit der Extrakte gegenüber Eiweiß- und Stärkespaltenden Fermenten und andern physikalisch-chemischen Einflüssen gipfelten. Die präzipitable Substanz der Extrakte zeigte unter anderem eine hervorragende Thermostabilität: sie verträgt anstandslos andauerndes Kochen, und selbst durch Temperaturen über 100° erweist sie sich nur nach längerer Einwirkung angreifbar; zu einer tiefgreifenden Spaltung kommt es erst nach Heranziehung hoher Temperaturen und starker Mineralsäuren.

Dieses Verhalten, welches demjenigen der Präzipitogene bei Typhus und Cholera entspricht und auch von Granucci, Schütz, Pfeiler und Hecht bestätigt wurde, haben wir praktisch verwertet und darauf unsere Thermopräzipitationsmethode aufgebaut. Unter Heranziehung der Thermostabilität des Präzipitogens kommt man nämlich einfach und rasch zur Gewinnung eines Extraktes für die Präzipitinreaktion, wenn man ein Stück des verdächtigen Materials mit der 5- bis 10fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung kocht und das Dekokt durch Asbest filtriert, wie wir weiter unten ausführlicher beschreiben werden. Auf diese Weise wird das ganze Verfahren derart vereinfacht, daß es in dieser Form auch dem Praktiker ein Leichtes ist, daraus Nutzen zu ziehen.

Osiander schlägt vor, die Widerstandsfähigkeit der präzipitablen Substanz gegen Temperaturen von 80 bis 120° auch in der Weise praktisch auszunutzen, daß das zur Untersuchung eingesandte Material am Feuer eingetrocknet würde. Er meint, es könne damit der Gefahr der Zerstreuung des Milzbrands durch den Versand wirksam begegnet werden, ohne die Sicherheit der Diagnose zu beeinträchtigen.

#### c) Verhalten gegen Konservierungsflüssigkeiten.

Daß Chloroform als vorzügliches Konservierungsmittel der reagierenden Milzbrandbestandteile zu gelten hat, ging aus unserer ersten Mitteilung hervor.

Zibordi gebührt das Verdienst, auf unsere Veranlassung das Verhalten des Präzipitogens Konservierungsflüssigkeiten gegenüber zuerst eingehend erörtert zu haben, nachdem Roncaglio bei einer seit Monaten in Alkohol aufbewahrten Milz noch eine positive Reaktion verzeichnet hatte. Von der Tatsache ausgehend, daß die praktischen Tierärzte, bei Einsendung von Organstücken milzbrandverdächtiger Tiere zwecks Sicherung der Diagnose, als Konservierungsflüssigkeiten Glycerin, Alkohol oder Formalinlösung zu benutzen pflegen, suchte er festzustellen, ob die Milzbranddiagnose noch möglich ist, wenn das Material in einer der obengenannten Flüssigkeiten aufbewahrt worden ist. Seine Ergebnisse beweisen, daß die Diagnose des Milzbrands mittels der Thermoreaktion auch in jenen Fällen möglich ist, in denen das zu prüfende Material in Alkohol, Glycerin oder Formalin konserviert wurde. Hingegen liegt es auf der Hand, daß Sublimatlösung zur Aufbewahrung von Milzbrandmaterial in solchen Fällen nicht geeignet ist. Selbst anhaltendes Waschen in fließendem Wasser ist nicht imstande, die Sublimatlösung gänzlich zu entfernen, und es genügen selbst ganz geringe Spuren von Sublimat, um bei Kontakt mit dem Serum an und für sich einen Niederschlag von Quecksilberalbuminat hervorzurufen. Die zur Entfernung des Sublimats aus den Geweben gebräuchlichen chemischen Verfahren sind zu umständlich und lang-

wierig, um bei Anstellung einer sicheren Schnelldiagnose in Betracht kommen zu können; überdies ist über das Verhalten des Präzipitinogens gegenüber  $\text{Hg Cl}_2$  nichts bekannt.

Auch Fleming, Lebre, Osiander, Granucci und Declich beschäftigten sich mit der Widerstandsfähigkeit des Präzipitinogens Konservierungsflüssigkeiten gegenüber. Der erstere dieser Forscher erhielt deutlich positive Reaktionen mit Material, das mehrere Tage in 96 prozentigem Alkohol und in konzentrierter Formalinlösung gelegen hatte; Lebre machte die gleichen Erfahrungen mit Milzbrandorganen, die 4 Monate in Alkohol lagen, und mit solchen, die 150 Tage im Eisschrank faulten. Zibordi und Osiander halten Alkohol für das zu diesem Zweck am besten geeignete Konservierungsmittel, da sie mit in 99prozentigem Alkohol aufbewahrt Material eine fast momentan auftretende Ringbildung erhielten, während nicht milzbrandiges, auf gleiche Weise konserviertes Material eine Reaktion niemals gab. Ebenfalls tauglich als Konservierungsflüssigkeit für Milzbrandmaterial erwiesen sich bei den Untersuchungen von Osiander Glycerin oder 2 prozentige Formalinlösung, während im Gegenteil Granucci eine Zerstörung der präzipitablen Substanz durch Formalin beobachtet hat und Declich sowohl Glycerin als Äther als nicht geeignete Konservierungsflüssigkeiten anspricht. Kreolin und Septoformlösungen müssen nach Osiander ausgeschaltet werden, da sie das Auftreten nicht spezifischer Trübungen veranlassen.

Endlich gelang Casalotti und Osiander die Diagnose mit Extrakten aus milzbrandigen Organen von Kadavern, die, mit Petroleum und Kalkmilch übergossen, längere Zeit im Boden verscharrt geblieben waren.

Vom praktischen Standpunkte aus ist es wertvoll, daß die Thermoreaktion sowohl der Einwirkung hoher Temperaturen und der Fäulnis widersteht, als auch durch Eintrocknen oder Konservierungsmittel, wie Alkohol und Chloroform, nicht beeinträchtigt werden kann.

#### d) Lokalisierung des Präzipitinogens.

Von großer praktischer Wichtigkeit sind die Erfahrungen von Granucci über die Bildung und Verteilung der präzipitablen Substanz im infizierten Organismus.

Es konnte dieser Forscher nämlich feststellen, daß die Organe ein und desselben milzbrandigen Tieres nicht immer und überall dieselbe Menge Präzipitinogen enthalten. Diese Substanz findet sich vielmehr in größter Menge in den Organen und Körperteilen, die am reichlichsten mit Bazillen durchsetzt sind, so daß Bildung und Gehalt an Präzipitinogen in direktem Verhältnis zur Zahl der Bazillen steht. Aus weiteren Versuchen ergab sich, daß das Präzipitinogen zuerst an der Impfstelle entsteht; es enthält z. B. das an der Eingangspforte des Virus auftretende Ödem die präzipitable Substanz an der Impfstelle und nicht in dem weiter entfernt gebildeten Exsudat. Bei experimentellem Milzbrand bildet sich während der ersten 12 Stunden das Präzipitinogen weder im Blute noch in den inneren Organen, es ist nach 24 Stunden zwar nicht in allen, aber doch in einigen Organen nachzuweisen und überschwemmt die übrigen Organe und das Blut erst in der Folge.

Diese Feststellungen sind insofern lehrreich, als sie uns über das Ausbleiben der Reaktion, das von uns bei experimentellem Milzbrand in Fällen mit spärlichem Keimgehalt zuerst verzeichnet wurde, deren Ursache in einem zu spärlichen Präzipitinogengehalt des betreffenden Materials liegt, näher orientieren und uns anweisen, besonders bei lokalem Milzbrande, das zu untersuchende Material tunlichst aus der Eingangspforte des Virus zu entnehmen.

## Die Extrakte für die Präzipitinreaktion.

### a) Herstellung.

Die Herstellung der Extrakte ist eine der wichtigsten Manipulationen zur Prüfung und Kontrolle des präzipitierenden Serums sowie bei Anstellung der Milzbranduntersuchung.

Für die Wertbestimmung und die Kontrolle des präzipitierenden Serums bedarf es zweier Extrakte, deren eines aus einer Reinkultur, das andere aus der Milz eines an Milzbrand eingegangenen Tieres bereitet wird.

Die Bereitung des Kulturextraktes soll nach unserer ursprünglichen Vorschrift in der Weise vorgenommen werden, daß eine 24 stündige Agarkultur in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt wird und 2 Stunden bei Zimmertemperatur in Berührung mit ihr bleibt. Bei Herstellung größerer Mengen soll dieses Verhältnis zwischen Milzbrandrasen und physiologischer Kochsalzlösung beibehalten werden; eine Abkürzung der Extraktionsdauer durch einfaches Aufkochen der Aufschwemmung ist hingegen zulässig. Das Extrakt wird hierauf durch Filtrierpapier oder durch eine Tonkerze filtriert und soll klar, höchstens leicht gelblich gefärbt sein.

Zur Bereitung des Milzextraktes werden nach dem ursprünglichen Verfahren 2 bis 3 g der mittels Quarzsandes fein zerriebenen Milzpulpa eines an Milzbrand eingegangenen Tieres, z. B. eines Meerschweinchens, zwecks Entfärbung mit 10 ccm Chloroform durchmengt und etwa 5 Stunden lang bei Zimmertemperatur in Berührung gelassen; nach Dekantierung des nicht verdampften Chloroforms wird der Brei mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und nach 2 Stunden durch Papier, eventuell Asbest, filtriert. Bei der Darstellung des Milzextraktes gehen wir nunmehr nach Einführung der Thermopräzipitinmethode in einfacher Weise so vor, daß wir ein größeres Quantum einer Rindermilz von einem klassischen Milzbrandfalle nach entsprechender Zerkleinerung mit der fünffachen Menge physiologischer Kochsalzlösung kurze Zeit am besten im Autoklaven aufkochen, nach dem Erkalten zuerst durch Papier und dann durch Berkefeld filtrieren. Das klare, fast farblose Filtrat wird in sterile Phiolen abgefüllt und ist so auf lange Zeit brauchbar. Über die Verwendung dieser Extrakte zur Einstellung des präzipitierenden Serums ist schon Seite 186—188 berichtet worden.

Die Gewinnung von Extrakt aus dem zu untersuchenden verdächtigen Material erfolgt entweder nach der Chloroform- oder nach der Kochmethode, wie sie obenstehend zur Herstellung der Testextrakte aus der Milz angegeben wurden. Nach der Thermopräzipitinmethode wird einfach das verdächtige Material nach der Zerstückelung in einem Reagenzrohr mit der 5- bis 10-fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung übergossen, auf einige Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt und nach dem Erkalten durch besondere Asbestfilter (siehe Seite 198) filtriert.

Schütz und Pfeiler haben bei der Herstellung der Extrakte, die im großen ganzen nach unserem Verfahren gemacht wurden, eine kleine Abänderung eingeführt, indem sie sowohl für den Kulturauszug als für das Organextrakt Karbol Kochsalzlösung als Lösungsflüssigkeit anwenden und die Milzpulpa mit 10 g weißen Glassandes gleichmäßig verreiben. Lebre und Granucci stellen ihre Extrakte mit gewöhnlichem Wasser, Isabolinsky und Patzewitsch mit destilliertem Wasser her, ohne daß dadurch der Ausfall der Reaktion eine Beeinträchtigung erlitten hätte.

Die Tatsache, daß sich das Antigen momentan extrahieren läßt, suchten Schütz und Pfeiler in der Weise zu einem Schnellverfahren zu verwerten, daß sie ein Stück geronnenen Blutes (von der Größe einer Haselnuß) mit 10 ccm Karbol Kochsalzlösung gut durchschüttelten, zu dem resultierenden, schmutzigrot gefärbten Extrakt 1 ccm Chloroform hinzufügten, wiederum gut durchschüttelten und filtrierten. Diese Methode besitzt jedoch keinen Vorzug vor der ursprünglichen Chloroformmethode, da die Klärung des Extraktes Schwierigkeiten bereitet und, wie

Schütz und Pfeiler selbst betonen, die Auszüge weniger Antigen enthalten, als es bei dem Chloroformextrakt der Fall ist.

Am besten geeignet für praktische Zwecke dürfte seiner einfachen und raschen Herstellungsart halber das Kochextrakt sein, d. h. das Extrakt, das unter Verwertung der Hitzebeständigkeit der präzipitablen Substanz durch einfaches Aufkochen des milzbrandigen Materials gewonnen wird.

Die Zubereitung desselben ist, wie gesagt, leicht zu bewerkstelligen: ein Stück des verdächtigen Materials wird mit der 5- bis 10fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung einige Minuten gekocht, man läßt das Dekokt erkalten und filtriert durch Filtrierpapier oder besser durch Asbest. Die Gewinnung des Extraktes auf diese Weise nimmt nur wenige Minuten in Anspruch.

Bei den vielseitigen Nachprüfungen unserer Methode ist die große Mehrzahl der Proben unter Verwendung dieser unserer Thermopräzipitinmethode mit Kochextrakt durchgeführt, welches als durchweg brauchbar erkannt worden ist. Schütz und Pfeiler geben der Chloroformmethode den Vorzug, da sie annehmen, daß bei Einhaltung derselben eine größere Menge Antigen in Lösung übergehe.

Wir selbst neigen der Meinung zu, daß der Gehalt der Extrakte an aktiver Substanz nicht so sehr mit der Extraktionsmethode als mit der Konzentration der Auszüge und mit der mehr oder minder günstigen Verteilung des Präzipitinogens in den verschiedenen Organen in Einklang zu bringen sei. Auf diesen Punkt werden wir übrigens noch später zurückkommen.

Daß die Herstellungsweise der Extrakte auf die Reaktion keinen besonderen Einfluß ausübt, wird unter anderem auch von Oslander und Declich bestätigt, die bei vergleichender Heranziehung des Koch- und Chloroformextraktes zu gleichen Resultaten kamen und daher die weniger zeitraubende Thermoextraktion bevorzugten, zumal bei letzterer auch die störend wirkende Rotfärbung wegfällt, die nach Oslander mit der Chloroformmethode, namentlich bei der Milz, nicht leicht zu vermeiden ist.

#### b) Konzentration.

Die Konzentration des Extraktes, die bei Anstellung der einfachen praktischen Untersuchungen, speziell am frischen Material, keine wichtige Rolle spielt, wie ganz richtig Favero bemerkt hat, wird hingegen bei Nachprüfungen, bei ausführlicheren Laboratoriumsversuchen, bei der Wertbestimmung des Serums und bei Entscheidung schwieriger Fälle zu einem höchst wichtigen, empfindlichen Faktor. Speziell bei Nachprüfungen sollten die Proben mit dem Extrakte in Verdünnungen (1 : 10—25—50—100—200—500) nie unterlassen werden, in denen die präzipitable Substanz in der Regel in solcher Menge und unter solchen Bedingungen enthalten ist, daß zum Auftreten der spezifischen Ringbildung die günstigsten Verhältnisse vorliegen. A priori müßte man zwar annehmen, daß die stärkste Konzentration die besten Resultate ergeben sollte; und dies trifft in der Tat im allgemeinen zu. So konnte auch Roneaglio in seinen Versuchen über den Einfluß der Konzentration der Extrakte auf den Ausfall der Reaktion feststellen,



daß die Ringbildung desto früher, deutlicher und schneller eintritt, je mehr der Milzbrandextrakt konzentriert und je stärker und energischer das Präzipitationsvermögen des verwendeten Serums ist. Er erzielte je nach der Aktivität der Sera und der Konzentration der Extrakte sofortige deutliche, sowie schwächere und langsamere auftretende Reaktionen.

Bei Verdünnung der Auszüge im Verhältnis von 1 : 10 bis 1 : 100 konnten wir sowie Lebre, Roncaglio, Flemming, Isabolinsky und Patzewitsch in der Regel das momentane Eintreten der Reaktion wahrnehmen. Oberhalb dieser Grenze fingen die Resultate an, in Zeit und Stärke abzutönen. Wir haben des weiteren schon an anderer Stelle erwähnt, daß die Extrakte beim Meerschweinchen schon in einer Verdünnung abzuklingen pflegen, bei der an klassischen Rindermilzen noch deutlich positive Reaktionen erzielt werden. Flemmings Extrakte aus Material von experimentellem Milzbrand reagierten bis zur Verdünnung von 1 : 400 momentan, oberhalb dieser Grenze erst nach 5 Minuten. Fischöder erhielt mit Extrakten aus Material von spontanen Milzbrandfällen bis zur Verdünnung von 1 : 800 noch deutlich positive Reaktionen; bei experimentellem Milzbrand beobachteten Isabolinsky und Patzewitsch in Verdünnungen von 1 : 200 das Auftreten der Ringbildung erst nach 5 bis 8 Minuten. Es ist jedenfalls bei Beurteilung der Reaktion auch der Faktor „Zeit“ zu berücksichtigen, worauf wir später näher eingehen werden.

In meiner ausführlichen Mitteilung vom 1. Januar 1911 machte ich darauf aufmerksam, daß stark konzentrierte Extrakte auch mit Normalserum zu reagieren vermöchten. Daß mit einem mit Phenol versetzten Serum paradoxe Erscheinungen auftreten können, hat in richtiger Erkenntnis der Sachlage Flemming hervorgehoben, welcher mit konzentrierten Milzextrakten das Ausbleiben der Reaktion feststellte, die erst nach Verdünnung der Auszüge in klassischer Weise sich einstellte. Umgekehrt können in konzentrierten Extrakten Substanzen (Produkte der Autolyse, der Verwesung und der Verseifung) vorkommen, die nicht spezifische Ringbildungen auszulösen vermögen. Diese Fehlerquellen sind leicht durch Verdünnung der Extrakte auszuschalten.

Die Anwendung der Extrakte in höherer Verdünnung ist besonders dann am Platze, wenn der Verdacht besteht, es handle sich im betreffenden Falle um Verunreinigung mit milzbrandähnlichen Bazillen. Bei einer Verdünnung von 1 : 50 und darüber, bei der echter Milzbrand immerhin noch deutlich reagiert, unterbleibt in der Regel jede Ringbildung, die durch diese nicht pathogenen, aber verwandten Keime bedingt sein könnte.

### **Ausführung der Präzipitinreaktion.**

#### **a) Untersuchungen in Laboratorien und Nachprüfungsstationen.**

Die Ausführung der Präzipitinreaktion erheischt, wie nochmals hervorgehoben werden mag, ein gut präzipitierendes Milzbrandserum, welches bei Anstellung der

Schichtprobe eine sofortige Trübung an der Berührungsfläche zwischen Milzbrandextrakt und Serum bewirkt. Das Serum ist in der Weise zu kontrollieren, daß man es mit zwei, an anderer Stelle schon besprochenen Extrakten auf seine Wirksamkeit prüft; nämlich mit dem Extrakt einer Milzbrandkultur auf Agar und mit dem einer sicher milzbrandigen Milz. Diese Extrakte sollen mit dem spezifischen präzipitierenden Serum sofort die für die Ringprobe charakteristische Trübung geben, hingegen mit dem entsprechenden Normalserum eine Viertelstunde lang vollkommen klar bleiben. Außerdem empfehlen wir in einer Kontrollprobe festzustellen, daß das präzipitierende Serum mit dem entsprechenden Normalorganextrakt keine Ringbildung gibt; letzteres wird am zweckmäßigsten aus einer nor-



Fig. 2.

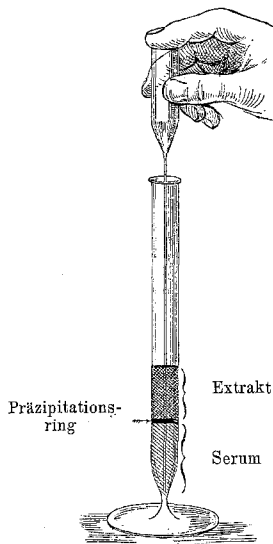


Fig. 3.

malen Rindermilz nach denselben Vorschriften hergestellt wie das Extrakt aus der milzbrandigen Milz.

Zur Filtrierung und Klärung der Extrakte sehr geeignet sind besonders Asbestfilter, wie ich sie in meiner ausführlichen Mitteilung beschrieben habe, die leicht am Gebläse aus einer gewöhnlichen Epruvette herzustellen sind.

Das Immun- und das Normalserum sind erforderlichenfalls am besten durch Zentrifugieren zu klären. Die Ausführung setzt unter allen Umständen die Verwendung klarer, farbloser Reagentien voraus.

Das Schema für eine Milzbranddiagnose mittels der Präzipitinreaktion gestaltet sich im Laboratorium folgendermaßen:

präzipitierendes Serum	+	Extrakt von dem zu prüfenden Material,		
„	„	+	„	aus der Milz eines an Milzbrand verendeten Tieres
„	„	+	„	aus einer Milzbrandkultur auf Schrägagar,
„	„	+	„	aus milzbrandfreiem Material,
„	„	+	physiologische Kochsalzlösung,	

Normalserum	+ Extrakt des zu prüfenden Materials,
„	+ „ aus der Milz eines an Milzbrand verendeten Tieres.

Bei Ausführung aller dieser Kontrollversuche, wie sie auch bei den andern serologischen Methoden gefordert werden, und Anstellung der Hauptprobe mit dem Extrakte des fraglichen Materials in verschiedenen Verdünnungen kann die Methode allen Anforderungen auf Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit Genüge leisten, gleichviel ob das Organextrakt nach der ursprünglichen Chloroformmethode oder einfach nach dem Kochverfahren hergestellt wird <sup>1)</sup>.

Zur Ausführung der Reaktion dienen uns kleine Standzylinder mit etwa 8 mm lichter Weite und einer Höhe von 7 cm die vor dem Gebrauch gut zu waschen, mit Alkoholäther zu trocknen und unmittelbar vor der Probe mittels eines Wattebausches gut zu säubern sind. Eine Sterilisierung ist dann nicht nötig.

Im Laboratorium, wo jederzeit P a s t e u r s c h e Pipetten bereit liegen, ist die Schichtprobe in der Weise anzustellen, daß man zuerst die Extrakte, bezw. die physiologische Kochsalzlösung, in die Standröhrchen in der Höhe von etwa 1 cm einfüllt und das Serum dann unter dieselben mit Hilfe P a s t e u r s c h e r Pipetten schichtet. Es braucht nicht besonders erwähnt zu werden, daß auch die

---

<sup>1)</sup> In einer vorläufigen Mitteilung, die noch Ende vorigen Jahres vor der medizinischen Gesellschaft in Parma gemacht wurde, jedoch erst am 16. April dieses Jahres im Centralblatt für Bakteriologie Originale Bd. 68 Heft 5/6 erschienen ist wird anscheinend die Spezifität der Thermoreaktion bei Milzbrand und Rotlauf in Abrede gestellt. Es sei mir gestattet darauf hinzuweisen, daß der Autor später (was aus obiger Mitteilung nicht hervorgeht) in der Sitzung vom 14. Februar 1913 derselben Gesellschaft (siehe Bericht im Policlinico Sezione Pratica Heft 13 vom 30. März 1913 Seite 452—53) erklärt hat, daß die von ihm benutzten, z. T. tagelangem Erwärmen unterworfen, Sera auch in den Kontrollproben mit physiologischer Kochsalzlösung positive Reaktion gaben. Diese Feststellung entzieht den in jener vorläufigen Mitteilung niedergelegten Beobachtungen jeden Boden: es liegt denselben ein prinzipielles Mißverständnis des Begriffes Spezifität zugrunde. Denn man könnte mit gleichem Rechte allen Immunitätsreaktionen jeglichen Wert absprechen, weil dieselben Erscheinungen (agglutinierte Hämolyse . . .) auch durch unspezifische Faktoren bewirkt werden können, der Hämolyse z. B. weil Hämolyse auch dann eintritt, wenn statt Kochsalzlösung destilliertes Wasser benutzt wird oder der Agglutination, weil sie durch Salzlösungen hervorgerufen werden kann.

Grundsätzliche Vorbedingung für einwandfreies Arbeiten auf diesen Gebieten ist eben die strenge Einhaltung solcher Bedingungen unter denen die gleichen nicht-spezifischen Effekte ausgeschlossen sind: zum Beweise, daß wir jedesmal dieser Forderung gerecht geworden sind, bedienen wir uns eben der Kontrollen. Sofern diese nicht stimmen sind die Versuche zu verwerfen. Dies gilt eben für obige Untersuchungen, welchen jeder Halt fehlt, da die Kontrollversuche mit Kochsalzlösung positiv ausfielen. Es ist einleuchtend, daß Blutsera, welche schon an sich, mit physiologischer Kochsalzlösung allein, einen Niederschlag geben, für spezifische Präzipitationsversuche absolut unbrauchbar sind. Es erübrigt sich bei dieser Sachlage auf die weiteren Verstöße des Autors gegen unsere Vorschriften einzugehen. (Anmerkung bei der Korrektur.)

Pipetten peinlichst gewaschen sein sollen; es gehört zu jeder Probe eine neue Pipette, die vor dem Gebrauche mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült wird.

Wenn zu Studienzwecken größere Untersuchungsreihen vorgenommen werden sollen, so hat die Prüfung des präzipitierenden Serums bloß am Anfang und am Ende der Versuche zu verfolgen, ebenso auch die Probe mit physiologischer Kochsalzlösung und jene zwischen Normalserum und Milzbrandextrakt, so daß die fortlaufenden Untersuchungen sich auf die Proben mit dem präzipitierenden Serum und die Kontrolle mit dem Normalserum derselben Tierart beschränken können.

#### b) Untersuchungen in der Praxis. — Das Anthraxdiagnostikum.

Um dem Verfahren Eingang in die Praxis zu verschaffen, mußten aber nicht nur die vielen Kontrollproben weggelassen werden, sondern es war auch die Ausführung der Reaktion in eine Form zu bringen, welche dem technisch nicht geschulten und über kein Laboratorium verfügenden Tierarzte zugänglich wäre. Zu diesem Zwecke ersannen wir einen Apparat, welcher die Filtrierung und automatische Schichtung des Extraktes oberhalb des Serums bewerkstelligt. Dieser Apparat (Textfig. 4) besteht aus einem der schon erwähnten Standzylinder und einem Trichterchen mit Asbestfilter, das in ein winkelig gebogenes Kapillarröhrchen ausläuft. Das präzipitierende Serum, das bereits an der Bezugsquelle auf seine Zuverlässigkeit geprüft wurde, ist in Spezialphiolen (Textfig. 5) abgefüllt, an deren unterem Ende eine kleine Erweiterung zum Auffangen und eine Verengung zum Zurückhalten der Spontantrübungen des Serums angebracht sind. In dem sogenannten Anthraxdiagnostikum <sup>1)</sup> werden dem Praktiker eben die nötigen Behelfe geboten, um die Reaktion an Ort und Stelle in einer viertel bis einer halben Stunde ausführen zu können. Der immerhin bedenkliche Verzicht auf die Kontrollproben, welcher mich bewog, diese Form der Reaktion bloß als ein diagnostisches Hilfsmittel zu empfehlen, wird zum Teil dadurch wettgemacht, daß beim frischen Material, an dem sie zur Anwendung kommt, einige Fehlerquellen wegfallen dürften, gegen die man mehr am verfaulten Material der Nachprüfungsstation anzukämpfen hat.

#### A b l e s u n g d e r R e s u l t a t e.

Zum genauen Verständnis des Reaktionsergebnisses ist zu bemerken, daß an der Berührungsfläche zwischen Milzbrandextrakt und Serum die Bildung eines fast momentan auftretenden Ringes, richtiger einer Scheibe, erfolgt, die während einiger Minuten an Intensität bedeutend zunimmt. Es erscheint, wie ganz richtig F l e m m i n g hervorhebt, zuerst an der Berührungsfläche der beiden Medien eine leichte,

<sup>1)</sup> Das Pharmazeutische Institut L. W. Gans in Oberursel a. T. liefert zwei Bestecke; in dem einen wird bloß das präzipitierende Serum ohne jeden Zusatz geliefert, mit dem Vermerk der Tierart, von der es stammt, so daß die Beschaffung des Kontrollserums ermöglicht ist; in dem andern wird das Kontrollserum mitgegeben.

dünnschichtige, grauweiße, homogene Trübung, mit einem Schein ins Bläuliche. Sie verbreitet sich bald, ist an ihrer Begrenzung nach oben und unten hin scharf abgesetzt und nimmt bald einen deutlich wolkigen Charakter an. Läßt man die aufeinandergeschichteten Reaktionsflüssigkeiten längere Zeit ruhig stehen, so beginnt die grauweiße Fällungssubstanz sich allmählich nach dem Boden des Glases hin zu senken, bis sie sich schließlich als Bodensatz abgeschieden hat. Diese gleiche Erscheinung macht sich beim Hauptversuch bemerkbar, wenn das verdächtige Material wirklich milzbrandig ist.

Bei den Kontrollproben mit präzipitierendem Serum und nicht milzbrandigem Extrakt oder mit Normalserum soll innerhalb einer Viertelstunde eine Trübung

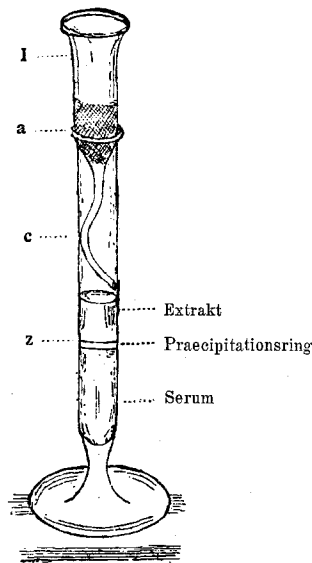


Fig. 4.

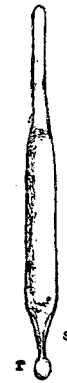


Fig. 5.

nicht auftreten. Die Berührungsebene erscheint in diesem Falle als stark lichtbrechende Fläche, die bei leichtem Schütteln sich schaukelnd bewegt.

Besonders beachtenswert sind die negativen Kontrollproben, auch jene mit physiologischer Kochsalzlösung die an der Berührungsfläche der aufeinander geschichteten Flüssigkeiten eine leichte Trübung erkennen lassen können. Um nun eine Fehldiagnose gegenüber den oben beschriebenen charakteristischen Präzipitationsfällungen zu vermeiden, ist es notwendig, diese Art Trübungen genau zu kennen. Es handelt sich hier ebenfalls um eine fast momentan auftretende, grauweiße Zone an der Grenze der beiden Medien; diese setzt sich jedoch nur nach oben einigermaßen scharf ab, verliert sich aber allmählich nach unten zu in der darunter befindlichen Flüssigkeit. Bei längerem Stehenlassen ist ferner keine Intensitätszunahme zu bemerken.

Wer Gelegenheit hatte, eine derartige diffuse Trübung etliche Male zu beobachten, dem ist es ein leichtes, sie von der scharf abgegrenzten, charakteristischen, spezifischen Reaktion zu unterscheiden.

Ein weiterer, nicht gering zu schätzender Faktor liegt in der zeitlichen Beurteilung der Reaktion. In der Regel stellen wir an eine deutlich positive Reaktion die Anforderung, daß die ringförmige Trübung sofort oder längstens nach 5 Minuten zum Ausdruck kommt, während wir die Beobachtungsdauer nach 15 Minuten für abgeschlossen erklären und den nach diesem Zeitraum auftretenden Trübungen einen spezifischen Wert absprechen. Bei Beurteilung der Reaktionen, die zwischen der 5. und 15. Minute zum Ausdruck kommen, müssen andere Erwägungen, betreffend das Verhalten der Kontrollen, die Konzentration des Extraktes, dessen Bazillengehalt usw. mitberücksichtigt werden; es wäre eventuell die Probe unter veränderter Versuchsanordnung zu wiederholen, worauf auch die heikleren Fälle in der Regel eine befriedigende Lösung finden dürften.

#### Untersuchungen bei experimentellem Milzbrand

Wie bei den meisten wissenschaftlichen Untersuchungen, deren Wiege das Laboratorium war, so mußten auch die ersten Versuche über das Präzipitationsverfahren bei Milzbrand aus äußeren, leicht begreiflichen Gründen an kleinen Versuchstieren durchgeführt werden, und es diente Material aus experimentellem Milzbrand auch bei allen späteren Versuchen als Kontrolle sowohl wie zur Lösung der verschiedenen, dem Problem anhaftenden Fragen.

Es kamen hierbei die verschiedensten Organe von experimentell infizierten Meerschweinchen, Kaninchen, Mäusen, Schafen, Ziegen und Tauben, aber auch Eseln und Pferden, zur Untersuchung. In der Regel wurde zwar das Material zur Anstellung der Schichtprobe aus der Milz entnommen; es konnten jedoch auch Blut, Muskeln, Haut, Hirnsubstanz usw. mit Erfolg verwendet werden. In Übereinstimmung mit dem etwas spärlicheren Keimgehalt trat mit Organen aus experimentell infizierten Tieren im Vergleich zu Material aus spontanen Milzbrandfällen gewöhnlich die Reaktion etwas schwächer und weniger prompt auf, sie ließ jedoch an Spezifität und Deutlichkeit nichts zu wünschen übrig. Daß bei experimentellem Milzbrand negative Resultate in Fällen mit spärlichem oder lokalisiertem Keimgehalt vorkommen, ist schon erwähnt worden.

Die ersten Bestätigungen, die durch Bierbaum, Pfeiler und Roncaglio der Methode zuteil wurden, waren beinahe ausschließlich mit frischem und verfaultem Material aus experimentellem Milzbrand ausgeführt worden. An ebensolchem Material fand zum Teil die Frage nach der Widerstandsfähigkeit des Präzipitinogens gegen chemische und physikalische Einflüsse Erörterung und Lösung sowie jene nach der Verteilung des Präzipitinogens in den verschiedenen Organen, nach dem zeitlichen Auftreten und Vordringen desselben von der Eingangspforte der Infektion aus. Ebenso hat erst die Prüfung der Sachlage an Versuchstieren uns über die praktische Tragweite der Einschränkung belehrt, die

sich aus der theoretischen Erkenntnis der Thermoreaktion als einer Gruppenreaktion ergab.

Da wir diese Punkte bereits in früheren Kapiteln eingehend besprochen haben, wollen wir uns an dieser Stelle nicht weiter damit befassen und lieber auf die noch nicht erörterte Frage über den Einfluß der Milzbrandimpfung auf den Ausfall der Präzipitinreaktion kurz eingehen, deren Lösung *Guerrera* bei Kaninchen in Angriff genommen hat.

Dieser Forscher versuchte es festzustellen, ob Tiere, die während oder nach der Milzbrandimpfung getötet werden, in ihren Organen Überreste von Bakterien enthalten, die imstande wären, eine positive Reaktion vorzutäuschen. Er stellte zum Zwecke die Thermoreaktion mit Organen von Kaninchen an, die teils mit dem ersten Impfstoff allein, teils mit dem ersten und zweiten Impfstoff behandelt worden waren, und endlich mit Organen von Tieren, die nach der doppelten Impfung überdies eine virulente Milzbrandkultur eingespritzt erhielten. Die Tiere wurden 8 bis 12 Tage nach Abschluß der Behandlung geopfert, und es ergab die mit ihren Organen angestellte Schichtprobe in sämtlichen Fällen negative Resultate.

Es zeigten demnach diese Versuche, daß der praktische Wert der Methode etwa durch eine Vortäuschung eines positiven Ausfalles bei den der Milzbrandschutzimpfung unterworfenen Tieren nicht beeinträchtigt werden kann.

### **Untersuchungen an Material aus der Praxis.**

Die Milzbranddiagnose ist zwar, wenn man von wenigen Ausnahmefällen bei bestimmten Arten (Mensch, Pferd) absieht, vom therapeutischen Standpunkte aus von untergeordneter Bedeutung, hingegen für die Anordnung und die Durchführung der Bekämpfungsmaßregeln äußerst wichtig, zumal in Ländern, in denen das Viehseuchengesetz für an Milzbrand gefallene Tiere eine Entschädigung gewährt.

Gerade bei der an den bakteriologischen Untersuchungsämtern stattfindenden Kontrolle der Diagnose treten die Schwierigkeiten besonders augenfällig zutage, gegen die häufig eine solche Nachprüfung anzukämpfen hat. So leicht nämlich durch Öffnung des Kadavers und anschließende mikroskopische Prüfung der Verdacht zur Sicherheit wird, um so schwieriger gestaltet sich der bakteriologische Nachweis, je später er versucht wird, d. h. je weiter die Fäulnis des zu untersuchenden Materials vorgeschritten ist. Trotz der zwecks Entnahme und Verschickung des verdächtigen Materials ausgearbeiteten und vielfach geübten Methoden (Seidenfäden nach *Heim*, Straßburger Gipsstäbchenmethode usw.) ist die Nachprüfung in etwa 20% der Fälle nicht imstande, die vom Tierarzte vertretene Meinung zu bestätigen, und zwar nicht nur in Fällen, bei denen bloß der klinische Verlauf und die sonstigen Verdachtsgründe vorlagen, sondern auch bei durch den Obduktionsbefund und die mikroskopische Prüfung begründeten Diagnosen.

So unanfechtbar der positive Ausfall der bakteriologischen Nachprüfung beim Milzbrand ist, ebensowenig kann ein negativer Befund an nicht mehr frischem Material dazu dienen, einen bestehenden Verdacht zu verneinen.

Sehr lehrreich ist z. B. in dieser Beziehung ein in den preußischen Jahres-Veterinärberichten erwähnter Fall, in dem irrtümlicherweise zwei Stücke desselben milzbrandverdächtigen Materials an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zur bakteriologischen Nachprüfung eingesandt wurden: die Untersuchung ergab an der frischen Probe ein positives, an der um 24 Stunden älteren ein negatives Resultat.

Diesem Übelstande kann nur in der Weise gesteuert werden, daß an Stelle des Nachweises der wenig haltbaren Milzbrandbazillen oder der leicht von andern Keimen zu überwuchernden Sporen eine serodiagnostische Methode tritt, welche die spezifischen Bestandteile der Bakterienleiber bzw. der bei ihrem Zerfall frei werdenden Produkte zu entdecken vermag.

In der Tat ist es unserer Thermoreaktion gelungen, die bestehende Lücke auszufüllen, und es wird ihr dieses Verdienst von allen Seiten her unbestritten zuerkannt. Die große Überlegenheit der Methode zeigt sich namentlich in denjenigen Fällen, in denen das Untersuchungsmaterial bereits so faul ist, daß die mikroskopische und bakteriologische Untersuchung für den Nachweis des Milzbrandes nicht mehr ausreichen. In solchen Fällen, in denen bisher aus den begleitenden Umständen (Zerlegungsbericht, Krankheitsverlauf usw.) geschlossen wurde, ob der Todesfall auf Milzbrand zurückzuführen sei oder nicht, wird diese Unsicherheit durch die Präzipitinreaktion beseitigt. Sie klärt nach dem ansehnlichen Zeugnis, das ihr S c h ü t z ausstellt, jeden Fall in wissenschaftlich einwandfreier Weise auf und gibt dadurch dem beamteten Tierarzte die sichere Grundlage für seine Handlungen und der Nachprüfungsstelle die Möglichkeit für gerechte und gleichmäßige Entscheidungen.

#### a) Bei Rindern.

Der schwerste Prüfstein für die Verwendbarkeit und den praktischen Wert unserer Verfahrens war zweifelsohne in deren Anwendung bei aus der Praxis stammenden Fällen gegeben. In erster Linie kamen hierbei Versuche an milzbrandigen oder milzbrandverdächtigen Rindern in Betracht, und es mußte ein Hauptwert auf ziemlich umfangreiche Untersuchungsreihen gelegt werden, aus denen sich statistische Daten entnehmen lassen.

Die ersten Proben an 15 milzbrandigen Rindermilzen mit durchweg positiven Ergebnissen sind von mir und V a l e n t i im April 1910 zusammengestellt worden. Abgesehen von den zahlreichen Untersuchungen, die von uns selbst im weiteren Laufe der Zeit ausgeführt wurden, und bei denen sich die Methode stets bestens bewährte, sind dann die ersten umfangreichen Nachprüfungen an Material aus der Praxis von S c h ü t z und P f e i l e r zwei Jahre später mitgeteilt worden. Diese Forscher wendeten das Verfahren in solchen Fällen von Milzbrand oder Milzbrandverdacht an, die bereits an einer andern Stelle bakteriologisch untersucht worden waren, ohne daß ihnen selbst das Ergebnis bekannt gewesen wäre. Aus diesem Grunde veranlaßte der Herr Minister für Landwirtschaft des Königreichs Preußen durch den Erlaß J. A. 3 und 6963 vom 22. Juni 1911 die Oberpräsidenten der Provinzen Ost- und Westpreußen, die Kreistierärzte beider Provinzen anzuweisen, außer der anderweit vorgeschriebenen Entnahme und Versendung von Proben an die Nachprüfungsstelle des dortigen Bezirkes auch dem Pathologischen Institute



zu Berlin von jedem milzbrandigen oder milzbrandverdächtigen Rind ein Stückchen Milz in einer vorgeschriebenen Packung als Eilbrief zu übersenden.

Daraufhin sind dem Pathologischen Institut in der Zeit vom 22. Juni 1911 bis zum 15. Januar 1912 insgesamt 45 Proben Materials zugegangen, das größtenteils in hochgradig faulem Zustand ankam. Die Untersuchung fand dort unverzüglich nach dem Eintreffen statt. In einer größeren Zahl von Fällen fiel die bakteriologische Prüfung, der vorangeschrittenen Fäulnis halber, bereits negativ aus. In allen Fällen ist nach dem früher beschriebenen Verfahren das Koch-, Schüttel- und Chloroformextrakt bereitet und mit diesem die Untersuchung auf das Vorhandensein von Milzbrandpräzipitinogen vorgenommen worden.

Es ergab sich, daß in 32 Fällen, in denen auf Grund der mikroskopischen und bakteriologischen Nachprüfung Milzbrand festgestellt worden war, dieses Ergebnis durch die Untersuchung mittels der Präzipitationsmethode gleichfalls ermittelt worden ist. Andererseits ist in 8 Fällen, in denen die mikroskopische und bakteriologische Nachprüfung das Nichtvorliegen der Milzbrandinfektion ergeben hatte, auch das Ergebnis der Präzipitation negativ ausgefallen. Somit stimmen in 40 Fällen, die mit Hilfe der serologischen Untersuchung gewonnenen Resultate mit denen der Milzbranduntersuchungsstellen überein. Ein besonderes Interesse für die Beurteilung des Wertes der Präzipitationsmethode zur Erkennung des Milzbrandes beanspruchen die weiteren 5 Fälle. Im ersten Falle hatte der beamtete Tierarzt auf Grund des bei der 2 Tage nach dem Tode vorgenommenen Zerlegung ermittelten Befundes den Milzbrandverdacht ausgesprochen. An der Nachprüfungsstelle waren Milzbrandkeime nicht ermittelt, es war aber auf Grund der schriftlichen Unterlagen Milzbrand angenommen worden. Das Ergebnis der Thermoreaktion lautete positiv, stimmte also mit dem lediglich auf Grund der schriftlichen Unterlagen abgegebenen Urteil überein.

Umgekehrt lagen die Dinge in einem zweiten Fall, in dem ebenfalls die mikroskopische Prüfung versagte und Milzbrandverdacht lediglich auf Grund der Zerlegung ausgesprochen wurde; hier fiel die Präzipitation negativ aus. Im dritten Falle war von dem beamteten Tierarzte Milzbrandverdacht ausgesprochen worden, nachdem er Milzbrandstäbchen ermittelt hatte. In der Untersuchungsstelle wurden Milzbrandkeime nicht gefunden; das Ergebnis der Präzipitation war gleichfalls negativ. Im vierten Falle hatte sich der beamtete Tierarzt auf Grund des Zerlegungsbefundes für das Vorhandensein des Milzbrandes ausgesprochen, obwohl durch die mikroskopische Untersuchung Milzbrandbazillen nicht zu ermitteln waren und auch die Nachprüfung negativ ausfiel. Das Ergebnis der Präzipitation aber zeigte, daß das Gutachten des Tierarztes zu Recht bestand; bei dem fraglichen Tiere hatte Milzbrand vorgelegen. Im fünften Falle endlich handelte es sich um eine Kuh, die, wie sich aus dem Ergebnis der Zerlegung ergab, an einer fibrinös-eitrigen Bauchfellentzündung gelitten hatte. Bei der mikroskopischen Prüfung und Nachprüfung sollen zahlreiche Milzbrandbazillen nachgewiesen worden sein, es lag jedoch eine Bestätigung durch die bakteriologische Untersuchung nicht vor. Im Pathologischen Institute waren in Ausstrichpräparaten Milzbrandkeime nicht nachzuweisen, auf den Plattenkulturen gingen Milzbrandkolonien nicht an, und die geimpften Mäuse starben an Septikämie und enthielten Milzbrandkeime nicht in ihren Organen; in Übereinstimmung mit diesem Befunden war auch das Ergebnis der Präzipitation ein negatives.

Eine noch größere Anzahl von Fällen aus der Praxis wurde ferner von S z y m a n o w s k i und Z a g a j a im Veterinärinstitut der Universität Krakau zur Untersuchung gebracht. Es handelte sich dabei um 70 Proben, bestehend aus Milz, Muskelausschnitten und Blut von Tieren, welche wegen Verdachtes auf Milzbrand getötet oder unter suspekten klinischen Symptomen spontan eingegangen und von den zuständigen Amtstierärzten an Ort und Stelle seziert worden waren. Die Organstücke wurden auf amtlichem Wege zur Untersuchung befördert, und es gelangte das Material mit Verspätung und bereits mit dem Ausfall der bakteriologischen Diagnose in die Hände der Forscher.

Während Schütz und Pfeiler ihre Untersuchungen zu Anfang mit von uns bezogenem präzipitierendem Milzbrandserum, später mit Seris eigener Produktion anstellten, wurden

die Versuche von S z y m a n o w s k i und Z a g a j a durchweg mit unserem präzipitierenden Serum durchgeführt. Wie schon P f e i l e r, so erkannten auch diese Forscher an, daß sich das Serum bei allen Proben als vorzüglich spezifisch und prompt reaktionsfähig zeigte. Das Serum wurde unter Lichtabschluß im Kühlraum aufbewahrt, und konnten diese Forscher im Laufe der ganzen Untersuchungszeit (über 6 Monate) keinen Rückgang der Wirksamkeit wahrnehmen. In einer großen Anzahl der Fälle ist die Prüfung zweimal ausgeführt worden; einmal gleich nach der Ankunft des Materials, das zweitemal nach mehreren Monaten. Abgesehen von ganz vereinzelten Ausnahmen, stimmten die Ergebnisse stets vollkommen überein, ungeachtet der weitgreifenden Verschimmelung und Fäulnis.

Zur Anstellung der Proben diente das Kochextrakt, welches nach unseren Vorschriften bereitet war und stets unverdünnt zur Reaktion verwendet wurde; anscheinend sind Proben mit verschiedenen Verdünnungen des Extraktes nicht ausgeführt worden.

Aus den Ergebnissen von S z y m a n o w s k i und Z a g a j a ist zu entnehmen, daß auf 69 untersuchte Fälle die Thermoreaktion 55 mal das Ergebnis der in der amtlichen Untersuchungsstelle ausgeführten bakteriologischen Untersuchung bestätigt hat; es waren darunter 33 positive und 22 negative Fälle; 11 mal hat die Thermopräzipitation den Milzbrand in solchen Fällen festgestellt, wo die üblichen Methoden im Stiche ließen, wodurch der auf klinischen und autoptischen Daten fundierte Milzbrandverdacht eine serologische Bestätigung fand. In zwei Fällen endlich zeigte die bakteriologische Prüfung ein positives, die Thermoreaktion ein negatives Resultat, welches durch Annahme eines geringen Gehaltes an Präzipitinogen erklärt wird.

Solche Ergebnisse, deren Aufgabe in der Bestimmung des relativen Wertes der beiden Prüfungsmethoden bestand, beweisen nach diesen Forschern in einwandfreier Weise die Vorzüge der serologischen Prüfung, da die Zahl der Fälle, in denen die bakteriologische Prüfung im Stiche ließ, viermal größer war als diejenige, in denen die Thermopräzipitinreaktion versagte. Es mag an dieser Stelle gleich erwähnt werden, daß solche negative Ergebnisse der Thermoreaktion wie in den zwei Fällen mit positivem bakteriologischen Befund auch einer andern Deutung zugänglich sein dürften, die durch die erwähnten Beobachtungen von F l e m m i n g über das Vorkommen paradoxer Phänomene bei der Thermoreaktion nahegelegt wird. Es ist wohl denkbar, daß ähnliche Hemmungen vorgelegen haben mögen, die erst durch Verdünnung der Extrakte ausgeschaltet und richtig ausgelegt werden können.

Sehr zugunsten unserer Methode fielen ferner die Versuche aus, die im Auftrage des Herrn Staatssekretärs des Innern durch Herrn Regierungsrat Prof. Z w i c k im Kaiserlichen Gesundheitsamte zu Berlin angestellt worden sind zum Zwecke der Prüfung der Frage, ob diese Methode auch in denjenigen Fällen sicheren Aufschluß zu geben vermag, in denen die bakteriologischen Untersuchungsmethoden versagen. Mit Genehmigung des Herrn Ministers für Landwirtschaft sind die Kreistierärzte der Provinzen Westfalen und Hannover angewiesen worden, dem Kaiserlichen Gesundheitsamte Material einzusenden von Tieren, die an Milzbrand oder unter milzbrandverdächtigen Erscheinungen verendet waren. Mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung und des sonst üblichen Züchtungsverfahrens wurde festzustellen versucht, ob wirklich Milzbrand vorliege.

Es kamen insgesamt 37 Proben (größtenteils kleine Milzproben) zur Untersuchung. In 32 Fällen wurde mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung und des Züchtungsverfahrens Milzbrand einwandfrei diagnostiziert. Eben diese 32 Proben benutzte Z w i c k für die weitere Untersuchung nach der Thermoreaktion, in der Weise, daß er dieses Verfahren zu einer späteren Zeit anwandte, wo es überhaupt nicht mehr gelingen konnte, den Milzbrandbefund mit den andern Methoden zu sichern. 14 Tage bis 6 Wochen nach der Einsendung, nachdem die Fäulnis an den Organproben sehr stark vorgeschritten war, wurden alle zunächst nochmal bakteriologisch geprüft.

In keinem Falle ist es nunmehr durch mikroskopische und kulturelle Untersuchung gelungen, die Diagnose auf Milzbrand zu stellen, wohl aber gelang es mit Hilfe des Präzipitationsverfahrens, und zwar konnte in allen 32 Fällen der Nachweis sofort einwandfrei und eindeutig geführt werden. Von den 5 Fällen, in denen bei der anfänglichen Untersuchung die bakteriologischen Methoden versagt hatten, konnten weitere 4 auf Grund des Ausfalles der Thermoreaktion als „Milzbrand“ angesprochen werden, während der Nachweis nur bei einem Falle mit sämtlichen Methoden versagte, so daß eine Milzbrandinfektion ausgeschlossen werden mußte. Zwick schließt aus dem Gesamtergebnis seiner Untersuchungen, daß in der Tat die Präzipitationsmethode berufen ist, in Zukunft sichere Auskunft über das Vorliegen von Milzbrand zu erbringen in Fällen, wo wir bis jetzt vor einem Fragezeichen standen und nicht imstande waren, zu unterscheiden, ob es sich um Milzbrand handle oder nicht, deshalb, weil die Fäulnis an dem Untersuchungsmaterial zu stark vorgeschritten und der Erreger der Krankheit infolgedessen zugrunde gegangen war.

Eine weitere umfangreiche Nachprüfung des praktischen Wertes der Präzipitationsmethode ist mit von uns geliefertem Serum von Dr. Fischöder, Chef der Untersuchungsstelle für Milzbrand zu Königsberg, angestellt worden. Es sind hierbei im ganzen 60 Fälle nach unserem Verfahren untersucht worden, wobei es sich größtenteils um Material aus milzbrandigen oder milzbrandverdächtigen Rindern, nur ausnahmsweise um solches von Pferden und Schweinen handelte. Von diesen 60 Fällen ist nur bei 19 das Vorhandensein von Milzbranderreger sichergestellt und in weiteren zwei Fällen auf Grund der begleitenden Umstände angenommen worden. In diesen 21 Fällen hat auch die Präzipitationsmethode stets eine positive Reaktion ergeben. Während Fischöder einerseits das Verfahren als höchst empfindlich und zuverlässig und den übrigen Methoden als weit überlegen bezeichnet, berichtet er andererseits über einen nicht unerheblichen Prozentsatz von Fehlergebnissen, in denen auch in Fällen, bei welchen Milzbrand ausgeschlossen wurde, eine deutliche Ringbildung auftrat. Fischöder gibt zwar an, daß die Einrichtungen seiner Milzbranduntersuchungsstelle zu umfangreichen Versuchen nicht ausreichten, um zu ermitteln, auf welche Ursachen diese Fehlergebnisse zurückzuführen waren.

Daß man sich jedoch bei Nachprüfungen in Untersuchungsstationen, wo das Material in verfaultem Zustande eintrifft, nicht auf die bloß als Hilfsmittel für den Praktiker am frischen Organ zulässige Hauptprobe beschränken darf, sondern mindestens den Kontrollversuch mit Normalserum heranziehen sollte, bedarf nach unseren Ausführungen keiner besonderen Erörterungen.

Außerdem dürfte einerseits ein technischer Fehler vorliegen, insoweit Fischöder die in zweifelhaften Fällen heranzuziehende Verdünnungsmethode auf die Aufschwemmung anstatt auf das Extrakt bezieht; andererseits eine verfehlte Auffassung der Sachlage, wenn er auf Grund des Versagens der bakteriologischen Untersuchungsmethoden an zersetztem Material Milzbrand ausschließt und dann den positiven Ausfall der Ringprobe als Fehlergebnis anspricht.

Es liegt ja auf der Hand, daß bei Nachprüfungen auch mit unbekannten Größen zu rechnen ist, d. h. mit solchen Fällen, bei denen durch den negativen Ausfall der bakteriologischen Untersuchung an verfaultem Material eine sichere Entscheidung nicht getroffen werden kann, da man nicht recht weiß, ob der negative Befund auf Versagen der Methode zurückzuführen ist oder darauf, daß von vornherein kein Milzbrand vorlag.

Es bleibt dadurch dem persönlichen Ermessen ein gewisser Spielraum offen, da nicht alle Forscher denselben Maßstab anlegen. Es ist dies eine Lücke, die die Beurteilung der Thermoreaktion an dem Materiale der Untersuchungsstationen

erschwert, aber auch Schlußfolgerungen, wie sie F i s c h ö d e r zieht, von vornherein verbietet.

Je vertrauter die Forscher auf Grund der Untersuchung frischen und experimentellen Materials, an dem der einheitliche Maßstab der bakteriologischen Kontrolle nicht versagt, mit der Methode werden, um so verlässlicher erscheint dann an faulen Organen die Thermoreaktion im Vergleiche zur bakteriologischen Prüfung und desto vorurteilsfreier klingt dann die Einschätzung der Ergebnisse, wenn Verwesung eingetreten ist. A l e x e i j e w, welcher sich in der bakteriologischen Station Semstwo der Provinz Tula zuerst mit unserem Serum an experimentellem Milzbrand einen richtigen Einblick in die Reaktion verschafft hatte, konnte nicht nur alsbald zur Darstellung eines eigenen präzipitierenden Serums übergehen, sondern dasselbe dann auch mit Vorteil bei Nachprüfungen verwenden, ohne bei seinen Kontrolluntersuchungen an Organen von Kälbern, Ochsen, Kühen, Ziegeln und Pferd das günstige Urteil über die Methode zu ändern.

Eine letzte ausgedehnte Versuchsreihe hat endlich D e c l i c h im Hygienischen Institute der Tierärztlichen Hochschule zu Wien angestellt, um den allgemeinen Wert der Thermoreaktion zu prüfen. Zu diesem Zwecke verwendete er die an die Station für diagnostische Tierimpfungen gelangenden Einsendungen von milzbrandigem Material, die bereits in der vorgeschriebenen Art und Weise geprüft waren. Die Versuche, die sich größtenteils auf Material von Rindern, nur ausnahmsweise auf solches von Pferden und Schafen bezogen, wurden nach unsern Vorschriften mit von uns hergestelltem Serum und bei gleichzeitiger Anstellung der nötigen Kontrollen durchgeführt. Von 82 Organproben waren 77 teils sofort, teils nach wenigen Minuten positiv, 5 negativ, obwohl der bakteriologische Nachweis positiv lautete, 1 negativ in Übereinstimmung mit der bakteriologischen Untersuchung. Das bei den oben erwähnten Fällen erhaltene Fehlresultat wird von D e c l i c h auf einen spärlichen Präzipitinogengehalt in den untersuchten Organteilen zurückgeführt, auch die Möglichkeit von paradoxen Reaktionen ist jedoch, wie wir an anderer Stelle schon andeuteten, nicht von der Hand zu weisen. Aus diesen Versuchen geht jedenfalls hervor, daß die Thermoreaktion tatsächlich ein ausgezeichnetes Hilfsmittel zur Milzbranddiagnose ist; denn die Fäulnis, die auf die Bakterien auflösend einwirkt, bedingte keine Zerstörung des Präzipitinogens, so daß eine Diagnose auch beim faulen Zustande des Kadavers ermöglicht wurde.

Die vorausgeschickten umfangreicheren Versuchsreihen an Material aus der Praxis haben also die praktische Verwendbarkeit der Präzipitationsreaktion bei der Milzbranddiagnose ausreichend bestätigt. Es fehlt jedoch nicht an lehrreichen Beispielen bei den Untersuchungen, die aus Mangel an nötigem Material sich nur auf wenige Fälle von spontanem Milzbrand beim Rinde beschränkten und im übrigen auf solche von experimenteller Infektion bei Versuchstieren sich erstreckten.

So gelangten zu entsprechenden günstigen Resultaten: R o n c a g l i o bei milzbrandigen Rindermilzen, die 34 Tage der Fäulnis überlassen bzw. 60 Tage in Alkohol konserviert waren; F l o r i s bei Milzen und Muskelsubstanz von Rindern, die 36 bzw. 48 Stunden früher an Milzbrand eingegangen waren; F l e m m i n g mit Herz, Lunge, Leber und Milz von milzbrandigen Rindern und C a s a l o t t i mit Milz- und Muskelteilen einer Kuh, die 45 Tage lang 2 m tief vergraben und mit Petroleum und Kalk übergossen waren. Über ähnliche zufriedenstellende Resultate berichten O s i a n d e r, der mit bis einen Monat der Fäulnis überlassenen oder vergrabenen Organteilen aus an Milzbrand eingegangenen Rindern noch deutlich positive Resultate erzielte, und noch weitere Forscher, die sich mit den Kontrollversuchen über die Brauchbarkeit unseres Verfahrens befaßten.

## b) Bei den Schweinen.

Über den Milzbrand beim Schweine hat erst die Literatur der letzten Jahre einige Aufklärung gebracht, da früher die Ansicht vorherrschte, daß diese Tiergattung immun gegen Anthrax sei oder daß die Erkrankung eines Schweines an Milzbrand wenigstens zu den größten Seltenheiten gehöre. In neuerer Zeit wurde jedoch von verschiedenen Seiten auf das häufigere Vorkommen von Milzbrand beim Schweine aufmerksam gemacht und namentlich darauf hingewiesen, daß bei dieser Tierart, an Stelle des bei Rindern überwiegenden septikämischen Charakters, die Krankheit meist einen chronischen, mildereren Verlauf, ohne ausgesprochene klinische Symptome, aufweise und in der Mehrzahl der Fälle einen rein lokalen Charakter besitze. In sehr vielen Fällen kann sogar der Erkrankungsherd oft auf eine einzige Lymphdrüse beschränkt bleiben, so daß durch die bakteriologischen Methoden in den andern Organen keine Milzbrandbazillen nachzuweisen sind.

Bei den günstigen Resultaten, welche die Thermoreaktion bei der Milzbranddiagnose am Rinde gezeitigt hat, lag es nahe, das neue diagnostische Verfahren auch bei der Milzbrandinfektion des Schweines heranzuziehen.

Der erste mittels der Präzipitationsmethode untersuchte Fall von Milzbrand beim Schweine ist von Zwick in einem am 9. Februar 1912 im Preußischen Landesökonomiekollegium gehaltenen Vortrage mitgeteilt worden. In der Milz dieses Schweines waren laut Bericht des beamteten Tierarztes, der die Probe eingesandt hatte, trotz längeren Suchens nur wenige Milzbrandbazillen zu finden gewesen. Mit Auszügen aus diesem Material angestellte Versuche ergaben insgesamt eine negative Reaktion. Zwick hat, wie er selbst bedauernd hervorhob, keine Gelegenheit zu einer weiteren Prüfung dieses Falles gehabt, da ihm nicht genügend Material zur Verfügung stand. Bei dem meist lokalisierten Charakter der Milzbrandinfektion beim Schweine ist obiges Fehlresultat leicht zu erklären.

Wie von Roncaglio, Granucci usw. hervorgehoben wurde, empfiehlt sich in solchen Fällen die Entnahme des Materials zwecks Anstellung der Schichtprobe an der Eintrittspforte des Keimes. Elsässer und Siebel haben in ihren Untersuchungen über lokalen Milzbrand beim Schweine diesen Umstand richtig zu würdigen gewußt, indem sie es als selbstverständlich bezeichnen, daß in derartigen Fällen das Material dem erkrankten Herde zu entnehmen ist, da die Reaktion des Muskelsaftes und des Saftes der nicht betroffenen Organe negativ ist. Es haben diese Forscher unser Verfahren in 5 Fällen zur Anwendung gebracht; in einem Falle, wo die sämtlichen andern Untersuchungsmethoden im Stiche ließen, lieferte die Schichtprobe, mit Extrakt aus der Gekrösdrüse, noch ein positives Resultat.

Material aus 3 milzbrandigen Schweinen und einem Wildschwein waren ferner in den Versuchsreihen von Fischöder mit einbegriffen, wobei die Schichtprobe in 3 Fällen mit Milzextrakt, in einem vierten mit dem Auszug aus der Lymphdrüse deutliche Scheibenbildung zeigte.

Auch Oslander hatte Gelegenheit, sich ein Stückchen Ohr und etwas Milzpulpa von einem Schweine zu verschaffen, das wegen Milzbrandverdachts notgeschlachtet wurde, ein Verdacht, der durch die mikroskopische Untersuchung sowie durch den Tierversuch bestätigt worden war. Das zur Anstellung der Präzipitinreaktion beiseite gelegte Material besaß jedoch bei der mikroskopischen Prüfung einen höchst spärlichen Keimgehalt, und es fiel die Reaktion in der Tat negativ aus.

Einen lehrreichen Bericht über eine kleine Milzbrandepidemie unter Schweinen verdanken wir Seibold. In einem Schweinebestande war nach Verfütterung von Rübenköpfen eine Art Futtervergiftung ausgebrochen, der in wenigen Tagen vier Tiere zum Opfer fielen. Bei einem Schweine bestand intra vitam eine Anschwellung am Halse und Atemnot, im übrigen zeigte die

Obduktion das Bestehen einer Gastritis haemorrhagica, wie bei Rotlauf oder akuter Schweineseuche. Das zur Untersuchung eingesandte Milzstück wies jedoch Infarkte auf, die den Verdacht auf Milzbrand erweckten. In der Tat lautete die mikroskopische Prüfung und das Kulturverfahren eindeutig auf Milzbrand.

Aus der Milzpulpa und aus den Knoten der Infarkte stellte Seibold teils nach der Chloroformmethode, teils mit dem Kochverfahren Extrakte her, die er zur Anstellung der Präzipitinreaktion verwendete. Diese fiel nun in beiden Fällen mit dem Auszug aus der Milzpulpa negativ, mit dem aus den Infarkten deutlich und momentan positiv aus.

Es beweist dieses Resultat neuerdings, daß man beim Milzbrande des Schweines außerordentlich vorsichtig in der Auswahl des Materials zur Extraktbereitung sein muß, wenn man ein entsprechendes Resultat erzielen will.

Auch Schmitz prüfte im Schlachthofe zu Düsseldorf den Wert der Thermoreaktion bei Feststellung des Milzbrandes beim Schweine, konnte jedoch, aus Mangel an Zeit, nicht in allen Fällen die Probe mit verschiedenen Organen anstellen. Er hebt hervor, daß zwar bei Untersuchung von frischen Fällen, wie man sie in der Schlachthauspraxis gewöhnlich antrifft, die Thermoreaktion entbehrt werden kann, daß ihre Verwendung aber bei älterem Material stets am Platze ist. Schmitz konnte sich im Laufe seiner Versuche überzeugen, wie überaus fein die Probe reagierte und wie sie namentlich bei älteren Fällen Außerordentliches leistete; besonders in die Augen springt ihre Unentbehrlichkeit, nach diesem Forscher, wenn bei auf dem Transport oder spontan verstorbenen Tieren bei uneröffnetem Kadaver die Diagnose gestellt werden soll.

In welcher Weise die vorsichtige Auswahl des Materials und die Anstellung der Probe mit allen nötigen Kontrollen auch bei der Milzbranddiagnose beim Schweine richtig zum Ziele führen kann, zeigen uns unter anderen die Beobachtungen von Pfeiler, der 5 äußerst kompliziert liegende Fälle mit der Präzipitinmethode richtig diagnostizierte. In vielen Fällen zeigte sich die Extrakterstellung aus den Gekröslymphdrüsen als zweckentsprechend, es ist jedoch dieses nicht immer zutreffend, sondern es muß die Auswahl des Materials bei jedem einzelnen Falle unter genauer Berücksichtigung des vorliegenden Befundes erfolgen.

### c) Bei andern Tierarten.

Außer bei Rindern und Schweinen wurden Versuche auch bei milzbrandigen oder milzbrandverdächtigen Pferden, Hammeln, Ziegen und Zicklein angestellt. Schieppati bediente sich ferner der Thermoreaktion zum Studium des Verhaltens des *Bacillus anthracis* in den Fischen.

## Weitere Anwendungen des Präzipitationsverfahrens bei Milzbrand.

### a) Bei getrockneten milzbrandigen Häuten.

Außer zur Diagnose des Milzbrandes an frischen und verfauten Kadavern von Pferden, Rindern, Schweinen usw. wurde die Thermoreaktion auch zum Nachweise derselben Infektion an getrockneten, zur Verarbeitung in Gerbereien bestimmten Häuten gebracht.

Über derartige Versuche berichtete zuerst Belfanti auf dem Kongreß für Lederindustrie, der im September 1911 zu Turin abgehalten wurde. Es zeigte dieser Forscher, daß die Schichtprobe mit präzipitierendem Milzbrandserum und Auszügen aus sicher milzbrandigen Häuten deutlich positiv ausfiel.

Zu einem gleichen Ergebnis gelangte Negrone, der das Verfahren an 11 bis 130 Tage getrockneten Häuten experimentell infizierter Kaninchen und Meerschweinchen sowie an von an

Milzbrand eingegangenen Rindern stammenden wiederholte. Ferner kamen zur Untersuchung getrocknete, zur Verarbeitung in der Gerberei bestimmte, aus China und Buenos Aires eingeführte Häute, von denen viele negativ, einige aber auch positiv reagierten. Der beständig negative Ausfall der Reaktion mit Auszügen von sicher nicht milzbrandigen Häuten einesteils und die deutlich positive Reaktion mit solchen aus an Milzbrand eingegangenen Tieren andererseits sprechen für die Spezifität und praktische Brauchbarkeit der Probe. Im gleichen Sinne lauten einige wenige von Deelich mit frischen, in Alkohol konservierten oder eingetrockneten, sicher milzbrandigen Hautstücken angestellte Proben.

#### b) Bei Nahrungs- und Futtermitteln.

Während die Versuche Rupperts mittels unseres Verfahrens den Nachweis milzbrandiger Verunreinigungen an Futtermitteln zu erbringen, an dem reichen Gehalt der pflanzlichen Stoffe an sogenannten Normalpräzipitinen scheiterten, waren hingegen die Bemühungen von Silva an getrockneten und gesalzenen Würsten von Erfolg gekrönt.

Es versuchte nämlich dieser Forscher, mittels der Präzipitinreaktion den Nachweis milzbrandigen Fleisches in Würsten, die das Salzen und Trocknen durchgemacht haben. Er verarbeitete daher gesunde Schweinemuskulatur, normales Schweinefett und milzbrandige Rinder-muskeln zu Mortadella (spezielle italienische Wurst) und untersuchte dieselben in der Folge nach der Thermoreaktion auf das Vorhandensein von Milzbrandpräzipitinogen. Andererseits versuchte er zur Kontrolle die Präzipitinreaktion an dem Handel entzogenen zersetzten Würsten sowie an Milz und Blut von an Meteorismus und Asphyxie eingegangenen Rindern und an Material aus einem an Staupe verendeten Hunde und einem an Geflügelpest gestorbenen Huhn.

Es ergab sich aus diesen Versuchen, daß die Thermoreaktion auch dann positiv ausfällt, wenn der milzbrandige Muskel die mit der Verfertigung der Mortadella verbundene Verarbeitung (Salzen, Trocknen) durchgemacht hat, eine Tatsache, die bei der Nahrungsmittelkontrolle von Wichtigkeit sein dürfte, namentlich in Anbetracht der Schwierigkeiten, die den Untersuchungen von Wurstwaren mit andern, gewöhnlich geübten Verfahren entgegenstehen. Zu solchen Untersuchungen dürfte das Verhalten der Präzipitinogene gegen tierische Membranen, von denen sie bei der Dialyse im Gegensatze zu den Salzen zurückgehalten werden, praktisch verwertbar sein.

#### c) In der gerichtlichen Medizin.

Daß das Präzipitationsverfahren auch bei medizinisch-gerichtlichen Problemen imstande ist, eine Entscheidung herbeizuführen, zeigt folgender von Leoncini veröffentlichter interessanter Fall.

Es war diesem Forscher vor mehreren Jahren vom Gerichte die Aufgabe auferlegt worden, zu entscheiden, auf welche Ursache der unter septikämischen Erscheinungen erfolgte Tod eines Stallknechtes zurückgeführt werden müsse. Es bestand zwar im allgemeinen der Verdacht auf Milzbrandinfektion, da aber der betreffende Leichnam schon seit 37 Tagen beerdigt war, war die Fäulnis bereits so weit vorangeschritten, daß sämtliche bakteriologische Methoden versagten, so daß die Streitfrage eine endgültige Lösung nicht finden konnte. Leoncini, der vom betreffenden Falle noch ein Stückchen Muskel in Alkohol konserviert hatte, untersuchte nunmehr auf unsere Veranlassung dasselbe auf den Gehalt an Milzbrandpräzipitinogen. Das in der Verdünnung von 1 : 4 hergestellte Kochextrakt gab bei Anstellung der Schichtprobe eine deutlich

positive Reaktion. Das betreffende Organstück, das vom 28. Juli 1906 bis zum 23. Juni 1911, demnach etwa 5 Jahre, in Alkohol konserviert lag, ermöglichte dank der Thermoreaktion, den Beweis zu erbringen, daß das in Frage stehende Individuum an einer Milzbrandinfektion gestorben war. Ähnliche Fälle sind nach privaten Mitteilungen vor kurzem in Görz und Pavia vorgekommen und bloß durch die in staatlichen Instituten ausgeführte Thermoreaktion richtig erkannt worden.

### Fehlresultate.

Den günstigen Beurteilungen der meisten Forscher, die das Präzipitationsverfahren bei der Milzbranddiagnose nachgeprüft und angewandt haben, stehen jedoch Mitteilungen gegenüber, die besagen, daß sich auch diese Methode in starre Formeln nicht fassen läßt, sondern daß bei ihr wie bei jeder biologischen Reaktion mit einigen Fehlerquellen zu rechnen ist.

Pfeiler meint, daß irreführende Ergebnisse nur dann möglich sind, wenn die zur Prüfung gelangenden Organe stark mit Bakterien, die den Milzbranderregern nahe stehen, infiziert sind, oder wenn die Zahl der in den Organen vorhandenen Milzbrandkeime eine zu geringe ist.

Preßler erhielt bei einem Kontrollversuche, zu dem er Blut von einer milzbrandigen Kuh als Antigen verwendete, negative Reaktion; er führt dies auf den wahrscheinlich zu geringen Titer des Serums zurück und glaubt, daß dasselbe durch die lange Lagerung im Laboratorium an Wirksamkeit verloren habe.

Ruppert untersuchte Stücke der Milz eines bakteriologisch gesicherten Milzbrandfalles und erhielt mit der Schichtprobe ein negatives Resultat. Es versagte in denselben Händen die Probe auch bei drei exhumierten Kadavern von Rindern, die nach dem Vorbericht als stark milzbrandverdächtig bezeichnet werden mußten; negativ soll unser Verfahren noch bei weiteren zwei Organstücken gewesen sein, die zwar nicht den Eindruck milzbrandiger Organe machten, obwohl mittels des Platten- und Impfversuches Anthrax konstatiert wurde.

Es seien ferner der negativen Reaktionen Erwähnung getan, die Rübiger, Zwick und Oslander bei vereinzelt Fällen von Schweinemilzbrand erzielten, sowie der Fehlresultate, über die Fischöder berichtet hat und deren wir bereits früher erwähnten.

Pfeiler äußert sich in einer Mitteilung über die Milzbranddiagnose mittels der Präzipitinreaktion am Schweine dahin, daß ein Teil der Fehldiagnosen auf mehr oder weniger große Fehler in der Versuchsanordnung zurückzuführen, ein anderer auf Rechnung von ungeeigneten Seren zu setzen sei.

Wir selbst haben im Laufe unserer Abhandlung die verschiedenen Fehlerquellen angedeutet, gegen die die Thermoreaktion anzukämpfen hat. Dieselben liegen einerseits in Vortäuschung positiver Reaktionen durch milzbrandähnliche Keime und durch die sogenannten Normalpräzipitine, welche letztere wir mehr als Trübungen aufzufassen geneigt sind, die beim Zusammentreffen des Serums mit nicht spezifischen Produkten der Hydrolyse entstehen dürften; wie wir schon angegeben haben, läßt sich hier eine Fehldiagnose bei entsprechender Verdünnung der Extrakte vermeiden. In dem andern Falle, wenn die Reaktion trotz des Vorliegens einer Milzbrandinfektion versagt, ist nur dann, wieder durch geeignete Verdünnung des Extraktes, Abhilfe zu schaffen, wenn eine paradoxe Reaktion vorliegt. Bei spärlichem Gehalt an Präzipitinogen kann hingegen einem negativen Ausfall der Reaktion nur in der Weise entgegengearbeitet werden, daß man in der Auswahl des zu untersuchenden Materials vorsichtig zu Werke geht. Wir sind im



übrigen überzeugt, daß bei Verwendung eines wirksamen, präzipitierenden Serums und bei genauer Einhaltung der Versuchstechnik diese einzige wirkliche Fehlerquelle, abgesehen vom lokalen Milzbrand, wie er beim Schwein, wohl auch beim Pferde und bei experimentellem Milzbrand angetroffen wird, kaum zu Fehlresultaten in der Praxis Veranlassung geben dürfte.

Das rege Interesse und die Anerkennung, die unserem Verfahren seitens der Forscher der verschiedensten Länder zuteil wurden, ist der beste Beweis für dessen praktischen Wert bei der Milzbranddiagnose.

Es ist die Präzipitinreaktion auch bereits in mehreren Staaten in die amtspflichtige Milzbrandbekämpfung aufgenommen worden.

So weist das Ministerium des Innern des Großherzogtums Hessen im Amtsblatt Nr. 467 (22. Januar 1912) die großherzoglichen Kreisveterinärämter an, daß in allen zweifelhaften Fällen dieses Verfahren angewandt werde; zu diesem Zwecke ist von Tieren, bei denen der Obduktionsbefund und die mikroskopische Untersuchung den einwandfreien Nachweis des Milzbrands nicht ergeben, ein Organstück (am besten von der Milz) in der Größe einer Haselnuß an die Rotlaufimpfanstalt einzusenden.

Auch seitens der Regierung von Anhalt und in Belgien ist unser Verfahren zum Nachweise des Milzbrandes als Hilfsmittel zur veterinärpolizeilichen Feststellung amtlich zugelassen worden.

In der 80. Versammlung des Vereins der Thüringer Tierärzte (Erfurt, 5. Mai 1912) wird durch *Hobstetter* mitgeteilt, daß im Großherzogtum Weimar künftighin alle Fälle von Milzbrandverdacht nach der Präzipitationsmethode durch die beamteten Tierärzte zu prüfen sind.

Im Königreich Bayern kann nach einer Entschliebung des Staatsministeriums des Innern vom 6. April 1912 die Präzipitationsmethode nach unserem Verfahren beim Milzbrand im Sinne des Milzbrandentschädigungsgesetzes bis auf weiteres nur als diagnostisches Hilfsmittel neben der bakteriologischen Untersuchung, nicht aber als Ersatzmittel für diese Untersuchung angewandt werden.

In diesem gleichen Sinne sprach das Mahnwort, das wir gelegentlich unserer ersten Veröffentlichungen unserer Methode mit auf den Weg gegeben haben, „es möchte dieselbe nicht ohne weiteres als ein Ersatzmittel angesehen werden, welches die andern Untersuchungsmethoden entbehrlich macht, sondern als ein diagnostisches Hilfsmittel, welches allerdings zur Sicherung der Diagnose hervorragende Dienste leistet“. Bei entsprechender Versuchsanordnung und der septikämischen Form, wie sie beim Rind und wohl auch beim Menschen in der Regel angetroffen wird, arbeitet jedoch die Reaktion mit solch mathematischer Exaktheit, daß ihr absoluter Wert in diesen Fällen kaum mehr in Abrede gestellt werden dürfte.

### **Anwendung der Thermopräzipitinreaktion bei Schweinerotlauf.**

Die Prinzipien, auf denen die Thermoreaktion beruht, lassen es begreiflich erscheinen, daß dieselbe bei der Diagnose des Milzbrandes bloß die erste Verwendung einer allgemeinen serodiagnostischen Methode bedeutet, welche in verdächtigen Materialien den Nachweis von bakteriellem, präzipitinogenem Protoplasma verschiedensten Ursprungs zu erbringen imstande sein dürfte.

Voraussetzung zur Verallgemeinerung der Methode sind im Einzelfalle: Herstellung des spezifischen, gut präzipitierenden Serums und Gewinnung geeigneter

präzipitinogenhaltiger Extrakte. Es wird voraussichtlich nicht geringe Mühe kosten, um diesen Forderungen bei den verschiedenen Infektionen entsprechen zu können.

Zunächst konnte beim Rotlauf der Schweine erfreulicherweise der Reaktion ein neues Arbeitsfeld in einfacher Weise erschlossen werden.

### Das Rotlaufpräzipitin.

Die Beschaffung von präzipitierendem Rotlaufserum gelingt nämlich viel leichter als jene des präzipitierenden Milzbrandserums, einestails weil der systematischen Gewinnung solcher Sera keine besonderen Schwierigkeiten im Wege stehen, andernteils weil die zu Schutz- und Heilzwecken dienenden hochwertigen Rotlaufimmunsera häufig auch ein ausreichendes spezifisch präzipitierendes Vermögen entfalten.

Das Rotlaufpräzipitin, das zuerst von V a n n e y bei gegen Rotlauf immunisierten Seruntieren nachgewiesen wurde, konnte von uns selbst bei Vorbehandlung des Schafes, des Pferdes und des Esels in kurzer Zeit gewonnen werden. Unter etwa 20 Seris verschiedener Herkunft von gegen Stäbchenrotlauf immunisierten Pferden wurde in der Mehrzahl der Fälle ein mehr oder weniger ausgesprochenes Präzipitationsvermögen gegenüber den Extrakten von spontan infizierten Schweinen und an experimentellem Rotlauf eingegangenen Tauben angetroffen. Die Reaktion fand nicht statt mit den Kulturextrakten verschiedener Mikroorganismen sowie mit den Extrakten von milzbrandigen Rindermilzen und von Organen gesunder Schweine und Tauben. Die Reaktion, die mit entsprechendem Serum bei Kontakt mit Rotlaufextrakten deutlich und rasch auftrat, war während der üblichen Beobachtungsdauer bei den Kontrollversuchen nicht nachzuweisen.

Die Spezifität des Rotlaufpräzipitins wurde in der Folge von mehreren Forschern (Iwicki, Zagaja, Silva, Isabolinsky und Patzewitsch, Seibold, Declich, Hecht, Gaus usw.) an unserem Serum bestätigt.

Während aber Zagaja mit gänzlich negativen Resultaten einige Versuche an einem Budapester Schweinerotlaufserum anstellte, erhielten Isabolinsky und Patzewitsch unter 5 daraufhin untersuchten Serien von russischen Rotlaufheilseris 5 mal brauchbare Resultate; es geben aber diese Forscher an, daß bei dem von uns gelieferten Serum der Präzipitationsring schärfer war und viel schneller auftrat als bei ihrem Heilserum.

Declich, der 12 Rotlaufsera verschiedener Herkunft auf ihr präzipitierendes Vermögen untersuchte, fand darunter 5, die dasselbe in hohem Grade besaßen, und Hecht ist ebenfalls der Meinung, daß bei Rotlauf wie bei Milzbrand der Gehalt eines Serums an Immunsubstanzen nicht immer mit jenem an präzipitierbaren Substanzen Hand in Hand gehen muß, da er mit einem staatlich geprüften Rotlaufserum keine Präzipitation erhielt, während das Serum des Budapester Jenner-Pasteur Institutes gut präzipitierend wirkte. Im letzteren Falle handelte es sich um das Serum eines Tieres, das seit Jahren mit virulenten Bakterienmengen (bis zu 100 ccm Bouillon in vierwöchentlichen Abständen) vorbehandelt worden war.

Wir wollen nicht unterlassen, daran zu erinnern, daß eine genaue Wertbestimmung des Rotlaufpräzipitins nach den bei Milzbrand aufgestellten Prinzipien in

jedem Falle, namentlich bei Anwendung der Reaktion im Laboratorium, am Platze ist, wobei das Serum vergleichend mit Bouillonkulturfiltraten und Rotlauforganextrakten sowie mit normalen Organextrakten vom Schwein und von der Taube zu prüfen ist.

### Das Rotlaufpräzipitinogen.

Nachdem wir uns durch Immunisierung des Esels in klassischer Weise den Besitz eines gut präzipitierenden Rotlaufserums gesichert hatten, machten wir uns an das Studium des Rotlaufpräzipitinogens, d. h. der im Rotlaufmaterial enthaltenen Substanzen, die zusammen mit dem spezifischen Präzipitin des Serums zur Auslösung der Ringbildung führt.

Ähnlich wie beim Milzbrande kann auch beim Rotlauf ein beliebiges zur Verfügung stehendes Organstückchen zur Diagnosestellung mittels der Thermo-reaktion verwendet werden. Wir selbst gebrauchten zum Zwecke in der Regel Herz samt Blutgerinnsel, Nieren und Muskeln, außerdem erwiesen sich als tauglich Blut und Milz (Silva, Iwicki, Canejo, Gaus), Lunge und Leber (Isabolinsky und Patzewitsch, Gaus), Darm, Haut, Drüsen, Muskulatur (Declich, Gaus), wobei der Grad der Reaktion dem größeren oder geringeren Präzipitinogengehalt des untersuchten Materials entsprechend mehr oder weniger ausgesprochen war.

Das Verhalten des Präzipitinogens den physikalischen und chemischen Einflüssen gegenüber war ähnlich dem bei Milzbrand beobachteten.

Dieses gilt in erster Linie für die Hitzebeständigkeit der präzipitinogenen Substanz: in der Tat konnten die daraufhin geprüften Rotlaufstämme und Extrakte als thermoresistent erwiesen werden, ein Befund, der seitens sämtlicher Forscher, die unsere Methode bei Rotlauf nachgeprüft haben, vollständig bestätigt wurde.

Nach Hecht beträgt die oberste Grenze der Erhitzbarkeit 190° bis 200° C. Rotlauforganstückchen, die auf Glasplatten im Sterilisierschrank bei 160° gehalten, sodann mit physiologischer Kochsalzlösung über der Bunsenflamme aufgeköcht wurden, ergaben bei der Schichtprobe eine deutliche Reaktion, ein Beweis, daß die praktisch bei der Verarbeitung von Fleisch in Betracht kommenden Temperaturen nicht imstande sind, das Präzipitinogen zu zerstören. Bei lang anhaltender starker Erhitzung können zwar einzelne Gruppen der Präzipitinogene zerstört werden, so daß nunmehr die Reaktion etwas schwächer auftritt. So erhielt Hecht nach 10 Minuten langem Erwärmen des Materials eine deutliche Ringbildung auch mit weniger gut präzipitierendem Serum, während nach einstündigem Erhitzen der Extrakte ein positiver Ausfall nur mehr mit dem von uns gelieferten stark präzipitierenden Serum zu erzielen war. Hecht, der eine halbstündige Beobachtungszeit für den Eintritt der Präzipitinreaktion bei Rotlauf als oberste Grenze ansieht, da außerhalb dieser Frist ihm häufig auch in den Kontrollseris durch Normalpräzipitine Reaktionen vorkamen, betrachtet einstündiges Erhitzen bei 200° als Grenze der Thermoresistenz der Präzipitinogene.

In getrocknetem Zustande ist auch die Resistenz des Präzipitinogens eine höhere, wie bereits Eisenberg durch halbstündiges Erhitzen auf 100° nachweisen konnte.

Die Resistenz des Rotlaufpräzipitinogens der Fäulnis gegenüber hat zwar bei der Diagnosestellung des Schweinerotlaufs eine weit geringere Bedeutung als

bei Milzbrand, da bei dieser Seuche der bakteriologische Nachweis auch am zersetzten Materiale möglich ist, dank der hochgradigen Widerstandsfähigkeit des Rotlaufbazillus. Immerhin verdient diese Eigenschaft der präzipitablen Substanz hervorgehoben zu werden.

Mit verfaulten rotlaufigen Organen tritt nach Iwicki, Zagaja, Isabolinsky und Patzewitsch die Schichtprobe sogar deutlicher zum Ausdruck; es wird dieselbe auch durch mehrtägiges Verfaulen der betreffenden Organe in der Erde nach Canejo nicht beeinträchtigt. Nach Declich, Seibold und Gaus verhält sich das Rotlaufpräzipitinogen der Fäulnis gegenüber ebenso wie Milzbrandpräzipitinogen. Es sei jedoch bemerkt, daß Isabolinsky und Patzewitsch in 2 Fällen mit verfaultem Milzextrakt einer Rotlauftaube und Iwicki mit Milzextrakt eines Rotlaufschweines negative Resultate erhalten haben. In letzterem Falle ergab die Wiederholung des Versuches mit einer andern Serumprobe einen positiven Ausfall, so daß Iwicki dem Serum die Schuld des Fehlresultates beimißt; Isabolinsky und Patzewitsch hingegen geben an, die betreffenden Extrakte, zwecks Entfernung des Hämoglobins, übererwärmt zu haben, und sind geneigt, den negativen Ausfall mit diesem technischen Fehler zu erklären.

Wenn aber der Einfluß der Fäulnis die präzipitinogene Substanz nicht zu schädigen scheint, so vermag doch der vorangeschrittene Fäulnisgrad des Rotlaufmaterials aus einem andern Grunde die Spezifität unseres Präzipitationsverfahrens zu beeinträchtigen. Wir konnten uns nämlich anlässlich unserer Versuche, durch Verweilen der zu untersuchenden Organe im Brutschrank eine Anreicherung der Keime zu erzielen, davon überzeugen, daß unter diesen Bedingungen auch nicht rotlaufige Organe die Eigenschaft erwerben, eine Ringbildung auszulösen, wenn die Fäulnis überhand nimmt. Die Ursache dieser Fehlresultate glauben wir in erster Linie auf das Eindringen und die Vermehrung von Keimen der Gruppe des *Bacillus murisepticus*, die ja mit dem *B. rhusiopathiae suis* eng verwandt ist, am faulenden Material zurückführen zu dürfen. Tatsächlich ist auch die Präzipitinreaktion bei Rotlauf eine Gruppenreaktion, und es tritt die Ringbildung bei Schichtung des Rotlaufpräzipitins mit Murisepticuskultur-Filtraten, mit Extrakten aus mit Murisepticus verunreinigtem Material und an der Infektion mit Murisepticus verendeten Mäusen leicht ein. Es bedingt demnach das Eindringen und die Vermehrung der Murisepticusgruppe in faulenden Organen, aus welchen ja von Koch die Reinzüchtung des Murisepticus zuerst bewerkstelligt wurde, eine Gruppenreaktion, die die Spezifität der Probe bei Fäulnis derart gefährdet, daß ein positives Ergebnis an verfaultem Material mit Zurückhaltung beurteilt werden muß.

Der Frage über das Verhalten des Rotlaufpräzipitinogens verschiedenen Konservierungsflüssigkeiten gegenüber sind Isabolinsky und Patzewitsch sowie Declich und Gaus nähergetreten.

Um den Einfluß der Desinfizienten auf das Resultat der Reaktion zu prüfen, ließen die ersten Forscher 5prozentige Karbolsäure, 1prozentige Sublimatlösung und 95prozentigen Alkohol auf Herz, Leber und Milz von an experimentellem Rotlauf verendeten Tauben einwirken: nach 10 tägiger Konservierung verschwand die Reaktion nicht, sie wurde nur schwächer, und die Ringbildung erfolgte später. Natürlich müssen so konservierte Organe vor Anstellung der Schichtprobe tüchtig in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen werden, da sonst an und für sich bei der Schichtung ein Eiweißring entsteht. Zu etwas verschiedenen Resultaten gelangte De-

elich, nach welchem das Verhalten der Organe, je nach ihrer Konservierung, beim Rotlauf etwas von demjenigen bei Milzbrand abweicht: Organe, die in Alkohol konserviert waren, sollen nach Declich eine deutliche Verminderung ihres Präzipitinogehaltes aufweisen. Nach Gaus beeinträchtigt die Konservierung der Organe in Spiritus oder Formalin das Eintreten der Reaktion nicht oder nur schwach; Glycerin erwies sich als etwas weniger geeignet, und Septoform sowie Sublimatlösung waren gänzlich ungeeignet.

### Herstellung der Extrakte.

Die Herstellung der Extrakte gestaltet sich beim Rotlauf ähnlich wie bei Milzbrand. Dem Umstande Rechnung tragend, daß unserem Präzipitationsverfahren bei Rotlauf hauptsächlich als einfaches und rasches Diagnosemittel Bedeutung zukommt, wurde in der Mehrzahl der Fälle die langsamere Chloroformmethode beiseite gelassen und das Extrakt in Form des gewöhnlichen Kochextraktes hergestellt, wie es beim Milzbrand eingehend beschrieben ist.

Bei Laboratoriumsversuchen wurde jedoch von uns, Isabolinsky und Patzewitsch, sowie von Hecht auch mit Vorteil die Chloroformmethode herangezogen; es scheint sich dieselbe vor allem zur Herstellung der Extrakte aus verfaultem Material und zur Klärung der häufig sich trübenden Filtrate zu eignen. Das durch Kochen hergestellte Extrakt pflegt in solchen Fällen stark opaleszierend zu sein, und auch störende Spontantrübungen treten häufiger, überhaupt mehr als bei Milzbrand, auf; die Klärung gelingt nach Hecht durch Schütteln mit Chloroform, Zentrifugieren und wiederholtes Filtrieren. Auch längeres Verweilen des Dekoktes auf Eis erweist sich zur Entfernung solcher Übelstände vorteilhaft, da durch gründliches Abkühlen ein Teil der trübenden Fettstoffe auf dem Filter zurückgehalten werden kann.

Was die Konzentration der Extrakte anbelangt, so werden zweckmäßig Verdünnungen von 1 : 5—15—30—50 hergestellt; bei reichlichem Präzipitinogehalt der zu untersuchenden Organe kann jedoch die Probe mit weit höheren Verdünnungen, bis zu 1 : 500 (Canejo), deutlich positiv ausfallen. Hecht, der seine Versuche vergleichend mit einer Verdünnung der Extrakte zwischen 1 : 5 und 1 : 200 anstellte, beobachtete die schnellsten und deutlichsten Reaktionen bei Verdünnungen von 1 : 5; etwas später (bis nach 15 Minuten) trat die Ringbildung bei Verdünnungen bis zu 1 : 60 in Erscheinung, sie wurde jedoch undeutlich mit noch höheren Verdünnungen. Die etwas verschiedenen Resultate erklären sich hier wie oben in einfacher Weise durch die je nach dem verwendeten Serum wechselnde Stärke des Rotlaufpräzipitins.

### Technik des Präzipitationsverfahrens.

Die Technik der Thermoreaktion bei Rotlauf gestaltet sich anlehnend an die bei Milzbrand ausführlich angegebene Methodik. Die Probe wird im Laboratorium in den gewöhnlichen Standzylindern, in der Praxis mit Hilfe des Thermopräzipitindiagnostikums angestellt, welches eine Adaptierung des Anthraxdiagnostikums zur biologischen Diagnose des Rotlaufes darstellt, indem das präzipitierende

Milzbrandserum durch präzipitierendes Rotlaufserum ersetzt wird, das je nach seinem Präzipitationsvermögen konzentriert oder bis fünffach verdünnt zur Schichtprobe zu verwenden ist. Nur wenn die Probe mit den bei Milzbrand angegebenen Kontrollversuchen umgeben ist, wird ihr jedoch das Gepräge der Zuverlässigkeit verliehen.

Selbstverständlich ist die auf die Hauptreaktion beschränkte Probe bloß als ein Hilfsmittel zur Diagnosestellung anzusehen, dessen Wert durch die Kontrolle mit dem Normalserum derselben Tierart zu ergänzen ist.

### Versuche bei experimentellem Rotlauf.

Da der Rotlauf der Schweine in Italien ziemlich selten vorkommt, so konnte von uns mit Material von an natürlichem Rotlauf verendeten Schweinen die Reaktion nur in wenigen Fällen angestellt werden, und wir waren zu ihrer Ausarbeitung auf Fälle von experimentellem Rotlauf angewiesen.

Der Ausfall der Reaktion ist bei den gegen Rotlauf empfänglichen Versuchstieren ein verschiedener, in Übereinstimmung mit dem mehr oder weniger septikämischen Charakter, den die Infektion bei den einzelnen Tierarten annimmt. Bei der Taube läßt die Präzipitinmethode in der Regel nicht im Stiche, weil der Keim reichlich über die sämtlichen Organe verteilt ist: man findet ihn in beträchtlicher Menge im Blute, im Herzen, in den Muskeln, in den Nieren, der Leber und auch in der Lunge; dementsprechend fällt an diesem Versuchstiere die Thermoreaktion mit allen Organen positiv aus, vorzüglich aber mit Material aus Herz samt Gerinnsel, Nieren, Muskelsubstanz und Leber. Die Maus, die zwar ihrer geringen Größe halber zu derartigen Versuchen weniger geeignet ist, weist immerhin einen genügenden Präzipitinnengehalt in allen Organen (Milz, Niere, Leber, Blut Herz, Lunge) auf: die mit obengenannten Organen ausgeführten Proben fallen in der Mehrzahl der Fälle positiv aus, wenn auch weniger stark wie bei der Taube. Beim Kaninchen, bei dem auch mittels der mikroskopischen Prüfung nur eine geringe Anzahl der charakteristischen Stäbchenformen nachzuweisen ist, fällt die Präzipitinreaktion nur mit konzentrierten Extrakten oder überhaupt nicht positiv aus. Manchmal ist bei dieser Tierart umgekehrt allein die Thermoreaktion imstande, den Nachweis des spezifischen Protoplasmas zu erbringen, wenn wegen des zu spärlichen Keimgehaltes oder der erschwerten Erkennung der Bazillen die mikroskopische Prüfung im Stiche läßt und nur der kulturelle Nachweis positiv ausfällt. Das Kaninchen kann auch mit Vorteil zur Kontrolle und Bestimmung der mehr oder weniger großen Brauchbarkeit der verschiedenen Organe zur Präzipitinreaktion dienen: unter den zum Zwecke herangezogenen Organen (Milz, Niere, Leber, Blut, Herz, Lunge) eignet sich anscheinend das Herz samt Blut am besten.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse der mikroskopischen Prüfung mit jenen der Thermoreaktion ist zu entnehmen, daß die Resultate der beiden Methoden bei denjenigen Tierarten am besten übereinstimmen, in denen die Infektion zu einer klassischen Septikämie führt, d. h. bei der Taube und der Maus. Beim Kaninchen,

hingegen, wo dieses nicht der Fall ist, verlaufen die beiden Prüfungsmethoden nicht nur nicht parallel, sondern es lassen zuweilen die eine, zuweilen die andere, gelegentlich auch beide, im Stiche.

Es lehrt dieses Ergebnis, daß der Nachweis der präzipitinogenen Substanz und jener des Bazillenleibes auseinandergehalten werden sollen. Wo Präzipitinogen vorgefunden wird, muß der betreffende Mikroorganismus vorhanden sein oder gewesen sein: die biologische Reaktion, bei der die ungleiche Verteilung des Keimes ausgeglichen wird oder dessen weniger charakteristisches Aussehen nicht in Betracht kommt, kann jedoch mitunter den Nachweis einer Infektion ermöglichen, der der mikroskopischen Prüfung entgangen ist; umgekehrt kann unter Umständen letztere zum Ziele führen in Fällen, in denen des spärlichen Keim- bzw. des Protoplasma-gehaltes halber die Präzipitinmethode versagt.

Wie beim Laboratoriumsversuch, so ist auch für den Ausfall der Reaktion in Organen von spontan infizierten Tieren der Charakter der Rotlaufinfektion von größter Bedeutung. Wie bekannt, kann der Rotlauf beim Schweine die verschiedensten Formen aufweisen, von der septikämischen, akut tötenden Form zum milderen Hautausschlag und zum chronischen langsamen Verlauf. Die Zahl und die Verteilung der Keime und dementsprechend die Präzipitinogenmenge kann daher innerhalb der weitesten Grenzen schwanken: von einem Optimum, wo sämtliche Organe mit Bazillen überschwemmt sind und sogar die Blutgefäße davon strotzen, bis zu einem Minimum, wo die Keime nur in einzelnen Organen oder bloß an der Eintrittspforte spärlich vorhanden sind.

Die Präzipitationsreaktion beim Schweine wird demnach, je nach dem mehr oder minder großen Gehalt an bakteriellem Protoplasma bzw. in erster Linie je nach der Anzahl an Keimen, stärker oder schwächer ausfallen und bei Anstellung der Probe mit Material aus den Organen, in denen die Bazillen in größerer Menge enthalten sind, mehr Aussicht auf Erfolg haben. Der Obduktionsbefund und die Auswahl des zur Anstellung der Probe am besten geeigneten Materials (das Herz bei Vorliegen von Endokarditis, die Niere bei Glomerulonephritis, in gewissen Fällen Haut und Gekrösdrüsen) können zum guten Gelingen des Präzipitationsverfahrens wesentlich beitragen. Die bei der Infektion des Kaninchens gemachten Beobachtungen berechtigen zur Annahme, es vermöge die Thermoreaktion den Nachweis des spezifischen Protoplasmas in Fällen zu erbringen, in denen die mikroskopische Prüfung versagt; selbstverständlich ist dann eine Bestätigung durch den kulturellen Nachweis erforderlich. Bei unregelmäßiger Verteilung des Virus dürften ausnahmsweise auch an ein und demselben Material positive und negative Resultate beobachtet werden können, auch kann der Infektionskeim so spärlich vorhanden, eventuell auf die Eintrittspforte begrenzt sein, daß undeutliche oder negative Ausfälle wohl kaum ganz zu vermeiden sein sollten.

Gelegentlich der Versammlung des Vereins thüringischer Tierärzte in Erfurt gab R a e b i g e r unter Demonstration des Rotlaufpräzipitationsverfahrens bekannt, daß nach den in seinem Institut angestellten Versuchen mit von Mäusen stammendem Material die Reaktion stets besonders

deutlich mit Leberextrakten gelang. Entsprechende Kontrollen, die mit präzipitierendem Rotlaufserum und Leber-Milzextrakt gesunder bzw. mit Milzextrakten von an Milzbrand verendeten Mäusen vorgenommen wurden, verliefen negativ, desgleichen konnte mit normalem Schweineserum an Extrakten aus Rotlauforganen von Mäusen eine Reaktion nicht ausgelöst werden.

Canejo, dem ebenfalls Material aus an natürlichem Rotlauf eingegangenen Schweinen nicht zur Verfügung stand, prüfte den Wert der Thermoreaktion an Extrakten aus frischen und verfaulten Organen von experimentell mit Rotlauf infizierten Tauben und weißen Ratten und erhielt in Übereinstimmung mit der mikroskopischen und kulturellen Probe stets einwandfreie positive Reaktionen. In einem Falle war der Ausfall mit Organen einer Rotlauftaube, die 8 Tage in der Erde vergraben war, noch deutlich positiv. Negativ hingegen lauteten die Kontrollversuche mit Extrakten aus normalen Organen sowie mit Organauszügen von an Schweineseuche eingegangenen Ferkeln oder von solchen aus an Tuberkulose, Diphtherie, Milzbrand oder Kala-azar verendeten Tieren.

Auch Isabolinsky und Patzewitsch stellten ihre Nachprüfungen zum Teil mit Organextrakten künstlich infizierter Tauben und Mäuse an. Nach ihren Ergebnissen ist der Präzipitationsring am schärfsten mit Herzextrakten zu bekommen, dann folgen Milz, Leber und Lunge; mit Muskelextrakten erhielten diese Forscher negativen Ausfall. Für die Spezifität der Rotlaufpräzipitation sprachen einesteils die ständig positiven Ausfälle mit Rotlaufmaterial, andererseits das negative Ergebnis mit Organextrakten von Tieren, die an andern Krankheiten (Milzbrand, Wut, Tuberkulose) verendet waren, und von völlig gesunden Tieren sowie mit Kulturextrakten und Kulturen des *B. suis* septicus.

Zu positiven Resultaten gelangten Hecht und Deelich; ersterer auch mit 8 Tage bei Zimmertemperatur gehaltenen Organen von Rotlauftauben, letzterer teils mit Chloroform-, teils mit Kochextrakten aus Organen von experimentell mit Rotlauf infizierten Mäusen, Tauben und Kaninchen. Die Kontrollversuche mit gesunden Organextrakten führten hingegen in keinem Falle zur charakteristischen Ringbildung.

### Versuche in der Praxis.

Wie bereits erwähnt, konnten wir selbst aus Mangel an Material die Reaktion nur in wenigen Fällen von natürlichem Schweinerotlauf anstellen; sie fiel aber auch hier nicht allein an frischem, sondern auch an verfaulten Organen positiv aus, während die Kontrollversuche mit Organen normaler Schweine, mit milzbrandiger Rindermilz sowie mit normalem Serum negativ ausfielen. Bei einer Probe versagte das Präzipitinverfahren bei der gewöhnlichen Thermoextraktion, es wurde jedoch auch in diesem Falle unter Verwendung der Chloroformmethode und Herstellung mehr konzentrierter Extrakte die Diagnose auf Rotlauf einwandfrei festgestellt, ein Beweis, daß auch bei schwierig liegenden Fällen den Fehlresultaten entgegen-gesteuert werden kann. Da jedoch auf Grund dieser unserer eigenen spärlichen Erfahrungen ein Urteil über den praktischen Wert der Reaktion bei Rotlauf nicht abgegeben werden konnte, haben wir die Kollegen zu Nachprüfungen in der Praxis aufgefordert und ihnen zum Zwecke präzipitierendes Rotlaufserum zur Verfügung gestellt.

Daraufhin wurden unsere Ergebnisse zuerst von Silva nachgeprüft, und zwar an frischen und in Zersetzung begriffenen Organen von drei mit Rotlauf behafteten Schweinen. Außerdem führte Silva die Reaktion aus mit Organen von zwei mit Schweinepest behafteten Schweinen, von zwei gesunden Schweinen und mit einer milzbrandigen Rindermilz. Die Schichtprobe fiel



nur bei Verwendung der Organextrakte der drei mit Rotlauf behafteten Schweine positiv aus, in allen andern Fällen dagegen negativ.

Iwicki verwandte bei seinen Versuchen Nieren und Milzextrakte von an Rotlauf verendeten Schweinen, bei denen in jedem einzelnen Falle die Diagnose bakterioskopisch und kulturell gesichert war; bei einer ersten Versuchsreihe wurden die Organe in frischem Zustande, bei einer zweiten nach 4- bis 34tägigem Verweilen bei Zimmertemperatur untersucht. In allen Fällen der ersten Versuchsreihe fiel die Thermoreaktion positiv aus, jedoch waren in den einzelnen Proben bezüglich der Ringbildung, was Zeit und Stärke anbelangt, sehr große Unterschiede wahrzunehmen. Die mit frischem Material von nicht an Rotlauf verendeten Schweinen (Herz- und Lungenlähmung, Tuberkulose, Fischigkeit, Schweineseuche, Schweinepest) angestellten Versuche ergaben mit einer einzigen Ausnahme negative Resultate; in dem einen Falle (Schweineseuche) trat sofortige deutliche Ringbildung ein. Mit verfaultem Material trat einerseits die Ringbildung schneller und stärker auf als bei Verwendung von frischem Rotlaufmaterial, anderseits versagte die Reaktion bei 3 Fällen. Die Kontrollversuche mit faulem Material von nicht an Rotlauf verendeten Schweinen ergaben sowohl positive wie negative Reaktionen. Da der Arbeit von Iwicki Protokolle nicht beigegeben sind, ist eine ausführliche Besprechung der einzelnen Fehlergebnisse nicht möglich, sie dürften jedoch auf die Ursachen zurückzuführen sein, auf die wir zum Teil schon eingegangen sind, zum Teil erst später zu sprechen kommen werden.

Bei der großen Verbreitung des Schweinerotlaufs in Galizien fand es der Kgl. Bezirkstierarzt Dr. Z a g a j a von Interesse, den Wert unseres Verfahrens zur Feststellung des Schweinerotlaufs nachzuprüfen. Dank dem Erlasse der k. k. Stadthalterei in Lemberg vom 20. Dezember 1911, Z. I, XVII, 19 376, wurden diesem Forscher von den Amtstierärzten Proben vom Sektionsmaterial aus an Rotlauf eingegangenen Schweinen zur Verfügung gestellt; es kamen zur Untersuchung mittels der bakteriologischen und der serodiagnostischen Methode 27 Milzausschnitte und ein Stück Lunge. Als Kontrolle dienten Milzausschnitte von 10 gesunden Schlachtschweinen. Die Thermoreaktion hat in allen Fällen die Ergebnisse der mikroskopisch-bakteriologischen Prüfung bestätigt; nur in einem Falle versagte die Methode, es kam jedoch bei Verwendung einer andern Serumprobe mit dem gleichen Material zur Ringbildung, so daß Z a g a j a den negativen Ausfall der ungenügenden Wirksamkeit des Serums zuschreibt.

Die Bildung des Präzipitationsringes an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeiten kam gewöhnlich sehr schnell, ausnahmsweise erst nach 10 bis 15 Minuten zum Vorschein. Einwandfreie Resultate erzielte dieser Forscher auch mit verfaultem Material. Die Kontrollversuche mit den normalen Schweineorganen blieben sämtlich negativ.

Auch in dem Vortrage von Profé im Verein Rheinpreußischer Tierärzte wird der Wert unseres Präzipitationsverfahrens bei Rotlauf anerkannt und betont, daß diese Methode in manchen Fällen auch dann noch ein Resultat gibt, wenn die sonstigen Methoden versagen.

Die von Isabolinsky und Patzewitzsch auf ihr Verhalten der Thermoreaktion gegenüber untersuchten Organe von 9 an Rotlauf verendeten Schweinen reagierten ebenfalls schön positiv, sowohl in frischem Zustand als noch 20 und 40 Tage nach dem Tode der Tiere.

Untersuchungen, die Hecht an einigen Organen von an Rotlaufsepsis gefallenen Schweinen auszuführen Gelegenheit hatte, ergaben gleichfalls durchweg positive Präzipitationsresultate von verschieden starker Intensität. Auch mit stark bis auf 190 bis 195° erhitzten oder gebratenen Organen fielen die Reaktionen positiv aus. Gerade dieser Umstand läßt die Präzipitatinmethode für den praktischen Nachweis von Rotlaufsepsis an bereits verarbeitetem Material wichtig erscheinen.

In Einklang mit der bakteriologischen Kontrolle stand auch der Ausfall des Präzipitationsverfahrens in den Versuchen, die Declich mit Milz, Lunge, Leber, Niere, Herz, Darm, Haut (erkrankter Teile) und Drüsen von an Rotlauf verendeten Schweinen anstellte.

Weniger günstig lauten bei oberflächlicher Betrachtung die Resultate von Seibold, der die Organe von 46 Schweinen nach dem Präzipitationsverfahren untersuchte. Hierbei wurde

25 mal durch die bakteriologische Untersuchung Rotlauf nachgewiesen; 1 mal lag eine Mischinfektion von Rotlauf und Schweineseuche vor; 5 mal handelte es sich um Schweineseuche. Unter den 25 Rotlauffällen gab die Präzipitinreaktion 4 mal ein negatives Resultat, so daß selbst nach 30 Minuten langer Beobachtung eine Ringbildung nicht beobachtet werden konnte. In zweien dieser Fälle ist nach Seibold der negative Ausfall sicher auf den spärlichen Keimgehalt der betreffenden Organe zurückzuführen, da auch der mikroskopische Nachweis versagte und Rotlauf nur auf Grund der kulturellen Prüfung nachgewiesen werden konnte. Positiv lautete der Ausfall des Präzipitinversuches auch bei dem Fall von Mischinfektion von Rotlauf und Schweineseuche. Positive Reaktionen erhielt jedoch Seibold auch mit verfaultem Material aus an Schweineseuche eingegangenen Tieren: dieses Ergebnis dürfte wohl mit der Vermehrung rotlaufähnlicher Keime in den faulenden Organen in Einklang zu bringen sein, denn an frischem Material von Schweineseuche erhielt Seibold negative Reaktion. Bei den von Deelich mit Rotlaufpräzipitin bei Schweineseuche und Schweinepest angestellten Versuchen konnte eine Ringbildung niemals beobachtet werden.

#### Fehlerquellen und ihre Vermeidung. Wert der Thermo- reaktion bei Rotlauf.

Eine sichere Diagnose des Schweinerotlaufs liegt zunächst in veterinärpolizeilichem Interesse, da der Schweinerotlauf in mehreren Ländern der Anzeigepflicht unterliegt. Aber auch für den Tierbesitzer selbst ist eine einwandfreie Diagnose des Schweinerotlaufs insofern von Bedeutung, als seitens mehrerer Regierungen eine Entschädigung für Tiere zu gewähren ist, die infolge einer polizeilich angeordneten Impfung eingegangen sind. Außerdem bewilligen auch die Impfstoffgewinnungsanstalten unter gewissen Bedingungen Schadenersatz für Schweine, die trotz oder infolge der Immunisierung an Rotlauf zugrunde gehen.

Die klinische und pathologisch-anatomische Diagnose ist nämlich nicht zuverlässig genug, weil die bei Rotlauf auftretenden Veränderungen oft eines spezifischen Charakters entbehren. Allein ausschlaggebend ist der bakteriologische Nachweis des Rotlaufstäbchens, und zwar entweder bakterioskopisch, kulturell oder durch Impfung von Mäusen und Tauben.

Dank der großen Resistenz der Rotlaufstäbchen gelingt zwar der bakteriologische Nachweis nicht nur an ganz frischem, sondern auch an etwas älterem Material, es dürfte jedoch die diagnostische Verwertung einer biologischen Methode immerhin von großem Vorteil sein, weil sie geschaffen ist, den Ausfall der mikroskopischen Untersuchung zu kontrollieren und zu ergänzen und weil sie ihrer Einfachheit halber auch den nicht über Laboratoriumseinrichtungen verfügenden praktischen Tierärzten zugänglich ist.

Es kommt somit der Thermoreaktion bei Rotlauf zwar nicht die gleichgroße Bedeutung zu wie bei Milzbrand, doch ist ihr Wert als rasches und einfaches Diagnosemittel auch bei dieser Seuche keineswegs zu unterschätzen. Ähnlich wie beim Milzbrand bedarf es jedoch auch bei Rotlauf gewisser Vorsichtsmaßregeln in der Ausführung und Beurteilung des Präzipitationsverfahrens, wenn es zu brauchbaren, sicheren Resultaten führen soll, unter tunlichster Ausschaltung der jeder

empfindlichen biologischen Methode und somit auch unserem Verfahren anhaftenden Fehlerquellen.

Die Fehlerquellen der Thermoreaktion bei Rotlauf sind prinzipiell dieselben wie bei Milzbrand, nur treten sie vom praktischen Standpunkte mehr in den Vordergrund, so daß ein näheres Eingehen auf dieselben hier zusammenfassend gerechtfertigt sein dürfte, obwohl sie zum Teil schon an andern Stellen besprochen wurden.

Die Fehlresultate sind zweierlei Art: negativer Ausfall der Probe an sicher rotlaufigem Material, positive Ergebnisse an nicht rotlaufigen Organen. Wir wollen zunächst die Fälle der ersten Art besprechen. Diese Fehlerquellen sind uns schon aus unseren Ausführungen betreffs des Versagens der Thermoreaktion bei Milzbrand bekannt: es betrafen dieselben jedoch dort bloß den experimentellen Milzbrand sowie die praktisch zurücktretenden Milzbrandinfektionen beim Schwein und die gleichfalls nur ausnahmsweise beobachteten paradoxen Reaktionen.

Bei Rotlauf fällt aber vor allem der Umstand, daß bei geringem Präzipitinogengehalt die Probe versagen kann, insofern schwerer ins Gewicht, als die Anzahl der Bazillen bei gewissen Formen der praktisch im Vordergrunde stehenden Rotlauf-erkrankung des Schweines eine geringe und auf bestimmte Körperstellen beschränkte sein kann. Anderseits scheinen die paradoxen Phänomene auch mehr hervorzutreten als bei Milzbrand: die Beobachtungen, daß bei ein und demselben Material positive und negative Reaktionen nebeneinander auftreten können, mögen ja zum Teil auf die ungleiche Verteilung des Präzipitins und auf verschiedene Stärke des Rotlaufpräzipitins zurückzuführen sein, zum Teil sind sie aber unseres Erachtens dem Vorhandensein reaktionshemmender Körper in den Extrakten zuzuschreiben. Diese unsere Auffassung findet eine experimentelle Stütze in noch nicht veröffentlichten Versuchen, aus denen hervorgeht, daß entsprechend den auf andern Gebieten gemachten Erfahrungen schon ein gewisse Grenzen übersteigender Salzgehalt der Rotlaufextrakte die Reaktion zu unterdrücken bzw. zu verlangsamen imstande ist; die Hemmungskörper können, insofern es sich, wie bei Salzen, um dialysierende Substanzen handelt, durch Dialyse entfernt werden, da ja das Präzipitinogen von den Dialysierschläuchen zurückgehalten wird.

Inwiefern der Dialyse bzw. der Verdünnung der Extrakte ein praktischer Wert bei der Vermeidung dieser auf Hemmungen der Reaktion beruhenden Fehlresultate zukommt, wird erst durch Versuche aus der Praxis festzustellen sein: als Richtschnur bei der Entscheidung dieser Frage möge dienen, daß die Verdünnungen nach den Angaben von H e c h t sich innerhalb viel engerer Grenzen zu bewegen haben als bei Milzbrandextrakten, und daß die Versuche mit der Dialyse, die mit kleinen Schläuchen leicht zu bewerkstelligen sind, nicht über ein bestimmtes Zeitmaß (wenige Stunden) hinausgeschoben werden müssen, wenn Störungen durch allzugeringen Salzgehalt vermieden werden sollen. Es sei hier noch bemerkt, daß eine Erklärung für den negativen Ausfall der Reaktion an faulenden Organen, die in frischem Zustande positiv reagiert hatten, mehr in dem Auftreten solcher Hem-

mungskörper zu suchen sein dürfte, als in einer etwaigen Zerstörung des Präzipitinogens, die ja nach den übereinstimmenden Erfahrungen der Autoren bei der Fäulnis nicht stattzufinden scheint. Der Bildung solcher Hemmungskörper dürfte auch das Scheitern der Versuche zu verdanken sein, die wir anstellten, um eine Anreicherung des Präzipitinogens in Fällen spärlichen Gehaltes zu bewerkstelligen, die dann aber auch wegen der Gefahr der gleichzeitigen Vermehrung von Keimen der Muri-septicusgruppe abgebrochen wurden. Möglicherweise sind auch die widersprechenden Ergebnisse an faulen Organen zum Teil darauf zurückzuführen.

Wir kommen so auf die zweite Fehlerquelle zu sprechen, auf die Vortäuschung positiver Reaktionen an nicht rotlaufigem Material. An frischem Material scheinen solche Fehlresultate nicht aufzutreten, wenn mit Seris gearbeitet wird, die, wie angegeben, mit Rotlauf- und Normalextrakten eingestellt wurden. Selbstverständlich hat man im Einzelfalle mit der Möglichkeit einer Mischinfektion mit Rotlauf zu rechnen.

Bei Untersuchung von frischem Material dürften die Verhältnisse ziemlich einfach liegen, zumal wenn bei der Auswahl der zu prüfenden Organe mit Vorsicht vorgegangen wird. Sollten die zur Herstellung der Extrakte dienenden Organe einen spärlichen Präzipitinogengehalt aufweisen oder Hemmungskörper vorliegen, so sind einerseits obenstehende Winke zu beherzigen, anderseits ist die Probe mit verschiedenen Organstücken unter Heranziehen des Chloroformverfahrens und hochwertiger Sera anzustellen.

Anders gestalten sich die Verhältnisse bei Untersuchung von verfaulten Organen.

Hier haben wir, wie schon erwähnt, bei Rotlauf außer mit den nicht spezifischen hydrolytischen, auch mit dem Normalserum reagierenden, Produkten mit einer Fehlerquelle zu rechnen, die durch die Vermehrung der Keime der Muri-septicusgruppe in den faulenden Organen gegeben ist, auf deren positives Verhalten gegenüber dem Rotlaufserum an anderer Stelle (S. 216) schon eingegangen wurde.

Zwar müssen ja nicht bei allen Fäulnisprozessen solche den Rotlaufstäbchen verwandte Keime vorkommen, auch ist mit der Möglichkeit ihrer Maskierung durch gleichzeitige Bildung von Hemmungskörpern zu rechnen, so daß in der Mehrzahl der Fälle die Spezifität der Reaktion bei faulenden Organen nicht beeinträchtigt werden mag; immerhin muß jedoch diesem Umstande Rechnung getragen werden. Man kann dieser Fehlerquelle entgegenzusteuern versuchen, indem man die Verdünnung der Extrakte heranzieht oder nach dem Vorgange von H e c h t die Probe mit bis zum Sechsfachen verdünntem Serum wiederholt.

Immerhin ist es unverkennbar, daß die Verhältnisse bei Rotlauf für die Praxis nicht so günstig liegen wie bei Milzbrand, einerseits weil an frischem Material negative Reaktionen schwer zu vermeiden, anderseits weil positive Ergebnisse am faulen Organe bloß mit großer Vorsicht zu verwerten sind.

Daß aber bei richtiger Einschätzung der Fehlerquellen der Thermoreaktion auch bei Rotlauf eine praktische Bedeutung zusteht, geht schon aus den bisher

gesammelten Erfahrungen, die bei Berücksichtigung unserer Ausführungen nicht ungünstig lauten, hervor.

### Anwendung der Thermoreaktion bei Rauschbrand.

Eine weitere Anwendung konnte, dank den interessanten, im Budapestener Jenner-Pasteurschen Institute unter der Leitung von Prof. Detre ausgeführten Untersuchungen von H e c h t, der Thermoreaktion bei Rauschbrand erschlossen werden, da es diesem Forscher gelang, durch Immunisierung gegen diese Infektion ein spezifisches präzipitierendes Serum herzustellen. Die bakteriellen Präzipitinogene erwiesen sich auch in diesem Falle sowohl in den Rauschbrandkulturen als auch in den infizierten Organen als hitzebeständig.

Das zu diesem Zwecke verwendete Immunsorum stammte von einem seit langem mit Rauschbrandkulturen behandelten Pferde und besaß den Rauschbrandbazillenkulturen gegenüber einen Agglutinationstiter von 1 : 20 000. Auch R a m a z z o t t i hat im Mailänder Serotherapeutischen Institute durch intravenöse Behandlung beim Pferde nach nicht veröffentlichten Versuchen ein gut präzipitierendes Rauschbrandserum gewonnen.

Daß aber nicht allen hochagglutinierenden Rauschbrandimmunseris das Vermögen innewohnt, bei der Schichtprobe mit geeigneten Extrakten präzipitierend zu wirken, erhellt aus den Untersuchungen von D e c l i c h, bei denen die Überschiebung verschiedener Organextrakte eines an Rauschbrand eingegangenen Meerschweinchens mit einem hochagglutinierenden Rauschbrandserum negative oder in Ausnahmefällen sehr schwach positive Reaktionen herbeigeführt hatte.

H e c h t prüfte das ihm zur Verfügung stehende Rauschbrandserum auf seinen Gehalt an Präzipitin an einem Antigenextrakt aus Leberstückbouillonkultur, das nach kurzem Kochen (2 bis 3 Minuten) durch Filtrierung aufgeklärt wurde; es ergab dasselbe nur mit Rauschbrandserum Präzipitation, dagegen nicht mit zur Kontrolle verwendeten Rotlaufimmunseris und andern Seris. Ein zweites Extrakt, das durch Aufschwemmung eines Rauschbrandimpfstoffes (Lyoner Pulver), kurzes Aufkochen, Abkühlen und mehrmaliges Filtrieren hergestellt wurde, gab die Reaktion etwas schwächer, wahrscheinlich wegen eines geringeren Präzipitiningehaltes.

Es wurde ferner die Reaktion mit Organextrakten aus an experimentellem Rauschbrand eingegangenen Meerschweinchen ausgeführt.

Hierbei hielt sich H e c h t bei der Herstellung der Extrakte an die Kochmethode; er erzielte die deutlichsten Scheibenbildungen mit Leberextrakten, zumal wenn das verwendete Organ mit Gasblasen durchsetzt war, doch zeigten sich brauchbar auch Auszüge aus hämorrhagischer Muskulatur und aus den parenchymatösen Organen; bei letzteren war die Reaktion etwas weniger kräftig als bei ersteren.

Die Herstellung der Extrakte geschah in Kochsalzlösung im Verhältnis von 1 : 5 bis 1 : 10 aus den mit der Schere zerkleinerten und zerquetschten Organstücken durch 2 bis 5 Minuten langes Auskochen und gründliches Filtrieren. Nur in einigen Fällen, in denen das Extrakt opaleszierend war, wurde es mit Chloroform ausgeschüttelt und zentrifugiert.

Wie schon für Milzbrand und Rotlauf, so scheint auch bei Rauschbrand der Gehalt an Bakterien für die Stärke der Reaktion von Bedeutung zu sein.

Extrakte aus Leber und Muskulatur gaben nach 15 Minuten deutliche, nach 30 Minuten eine sehr scharfe Reaktion.

Die Versuche von H e c h t erstreckten sich auf 14 Fälle von experimentellem Rauschbrand; Organe von an spontanem Rauschbrand verendeten Tieren standen diesem Forscher nicht zur Verfügung. Das Serum wurde teils konzentriert, teils zu gleichen Teilen mit Kochsalzlösung verdünnt angewandt. Da andere Bakterienextrakte und Extrakte aus Organen von an andern

Krankheiten eingegangenen Tieren die Reaktion nicht gaben, so dürfte hiermit der Beweis erbracht sein, daß die Thermoreaktion auch zur Unterstützung der Rauschbranddiagnose verwendet werden kann.

### **Anwendung der Thermoreaktion bei Paratyphusinfektionen und Fleischvergiftungen.**

Um die Anwendung des Präzipitationsverfahrens bei Paratyphusinfektionen und Fleischvergiftungen haben sich voneinander unabhängig fast gleichzeitig Reinhardt und Murschel und Uhlenhuth und Rothacker verdient gemacht. Erste Bedingung für das Zustandekommen der Präzipitinreaktion ist auch hier ein genügend hochwertiges Serum mit präzipitierenden Eigenschaften.

Während Rothacker ohne weiteres die planmäßige Herstellung präzipitierender Antisera gegen Paratyphus B., Bacillus enteritidis Gärtner und Fleischvergiftungen selbständig in Angriff nahm, untersuchten Reinhardt und sein Schüler Murschel zunächst einige der im Handel befindlichen agglutinierenden Paratyphussera auf ihre präzipitierende Eigenschaft.

Es konnte jedoch nur mit dem in Pulverform im Handel befindlichen Präparate der sächsischen Serumwerke in Dresden eine Präzipitation mit Extrakten aus Paratyphus B.-Reinkulturen und aus den Organen von an Paratyphus eingegangenen Kaninchen erzielt werden. Da ihnen dieses Serum jedoch nur in ganz geringen Mengen zur Verfügung stand, so mußten auch diese Forscher die Herstellung eigener Sera in Angriff nehmen.

Die weiteren Versuche wurden mit zwei Seris angestellt, die zu Agglutinationsversuchen von zwei mit abgetöteten Paratyphusreinkulturen wiederholt vorbehandelten Kaninchen schon vor längerer Zeit gewonnen worden waren; beide besaßen die Eigenschaft, mit Paratyphusreinkulturextrakten sowie mit Organextrakten paratyphuskranker Tiere überschichtet, einen sofort oder binnen kürzester Zeit auftretenden Präzipitationsring zu bilden. Obwohl diese Sera vor 2½ Jahren gewonnen und ohne Konservierungsmittel aufbewahrt worden waren, hatten sie doch ihre Präzipitationswirkung nicht eingebüßt. Kontrollversuche mit Organextrakten von gesunden Tieren und von einer an Rotlauf verendeten Taube fielen negativ aus.

Um sich größere Mengen des präzipitierenden Paratyphusserums zu verschaffen, behandelten Reinhardt und Murschel mehrere Kaninchen mit subkutanen Injektionen von abgetöteten Paratyphus B.-Bazillenkulturen in Intervallen von 2 zu 2 Tagen in allmählich steigenden Dosen, und zwar insgesamt 4 mal.

Nicht alle, aber die meisten der so behandelten Kaninchen lieferten in ihrem Serum spezifische Präzipitine, doch war der Wert der präzipitierenden Sera ein verschiedener.

Von der Tatsache ausgehend, daß es sich bei der Fleischvergiftung in praxi in der Regel entweder um eine Vergiftung von Paratyphus B oder B. enteritidis Gärtner handelt, versuchte Rothacker der Einfachheit halber ein Mischantiserum herzustellen, indem er die Tiere gleichzeitig mit Paratyphus B und Gärtner - Bazillen vorbehandelte. Er nahm hierbei an, daß es mit einem solchen Serum gelingen würde, sowohl eine Mischinfektion als auch eine Infektion mit Paratyphus B oder Gärtner allein zu erkennen. Bei der Herstellung dieses Mischantisera verfuhr er folgendermaßen. Er schwemmte je 3 etwa 18 stündige Agarkulturen von B. paratyphus B und B. enteritidis Gärtner mit ungefähr 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung ab und erhitze diese Aufschwemmung im Wasserbad ½ Stunde auf 60° und behandelte mit diesen Aufschwemmungen Kaninchen in langsam steigenden Dosen von ½ bis zu 3 ccm. Die ersten 4 Wochen injizierte er intravenös, dann intraperitonäal, anfangs behandelte er jeden 3. Tag, dann in Intervallen von etwa 1 Woche.

Dabei zeigte sich, daß das Serum geeigneter Tiere nach 6 Wochen präzipitierte, während bei andern eine Vorbehandlung von 5 Monaten noch nicht genügte. Bei Anstellung der Schichtprobe mit 0,3 ccm klaren Paratyphusextraktes und 0,2 ccm Paratyphus B Gärtner - Antiserum

trat sofort an der Berührungsstelle ein deutlicher Präzipitationsring auf, während die Kontrollen mit Kochsalzlösung + Antiserum oder Paratyphus B Gärtner - Bakterienextrakt + normales Kaninchen Serum klar blieben. Es war damit festgestellt, daß diese Sera spezifisches Präzipitierungsvermögen besaßen, und somit konnte zu der eigentlichen Probe geschritten werden.

Die Herstellungsweise der Organextrakte zeigte sich ohne wesentlichen Einfluß auf die Reaktion. Reinhardt gewann sein Material aus Organen (Milz, Leber, Herz, Lunge, Nieren, Darm) und Muskulatur von künstlich mit Paratyphus B infizierten und nachweislich an dieser Krankheit verendeten Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen und verarbeitete sämtliche nach unseren Vorschriften teils nach der Chloroformmethode, teils mittels des Kochverfahrens. Er zieht jedoch die Kochextrakte den Chloroformextrakten vor, nicht nur der einfacheren, rascheren Herstellungsart halber, sondern weil sie auch in der Regel schon nach einmaligem Filtrieren klar und farblos und somit zu Präzipitationszwecken besser geeignet sind als die Chloroformextrakte, die häufig eine gelblichrote Färbung oder Opaleszenz aufweisen. Murschel erhielt die raschesten und deutlichsten Reaktionen mit der Milz, ihr folgten in absteigender Reihe Herz, Leber, Niere, Lunge, Muskulatur und Darm. Mit Muskelextrakten blieb mitunter die Reaktion gänzlich aus, zumal wenn mit einem nicht hochwertigen Serum gearbeitet wurde. Um solche Fehlergebnisse zu vermeiden, schlägt dieser Forscher vor, die Untersuchung gleichzeitig mit mehreren Organen anzustellen.

Was die Herstellung der Organextrakte anbelangt, teilt Murschel gänzlich die Meinung von Reinhardt, indem er dem Kochextrakt den Vorzug gibt.

Rothacker stellte seine Organextrakte aus dem Muskelfleisch von an experimenteller Infektion mit Paratyphus B und Gärtner - Bazillen eingegangenen Kaninchen her, und zwar indem er erst unsere Chloroformmethode genau einhielt, später an Stelle des Chloroform chemisch reines Azeton verwendete. Solche Azetonextrakte sollen nach diesem Forscher tadellos arbeiten. Mit dem nach unserer Vorschrift hergestellten Kochextrakt erzielte Rothacker eine etwas schwächere, aber doch noch deutliche Reaktion.

Mit der Verwendung des Kochextraktes zur Anstellung der Schichtprobe beweisen diese Forscher die Thermoresistenz des Paratyphus bzw. des Paratyphus B enteritidis Gärtner - Präzipitins.

Was das Verhalten der präzipitablen Substanz der Fäulnis gegenüber betrifft, so fanden Reinhardt und Murschel, daß dieselbe das Eintreten der Reaktion nicht oder nur unwesentlich zu beeinträchtigen vermag. Nach 12 tägigem Faulen trat der Präzipitationsring stets deutlich auf; nur in einem Falle, wo Muskulatur, die 75 Tage bei Zimmertemperatur gefault hatte, in Anwendung kam, trat eine positive Reaktion nicht ein, vielleicht des geringeren Bakteriengehaltes des betreffenden Muskelstückes halber.

Organe von paratyphuskranken Kaninchen und Meerschweinchen, die in 90 prozentigem Alkohol, 2 prozentigem Formalin oder reinem Glycerin 75 Tage lang konserviert worden waren, lieferten ebenfalls noch deutliche und charakteristische Reaktionen; es sind demnach diesen Forschern zufolge Alkohol, Formalin und Glycerin als geeignete Konservierungsflüssigkeiten anzusehen für Organe, die später zur Thermoreaktion verwendet werden sollen. Dagegen sind, auch nach den Erfahrungen derselben Forscher, Septoform und Sublimat zu verwerfen; letzteres vermag an und für sich durch Bildung von Quecksilberalbuminat eine Trübung hervorzurufen.

Bei Anstellung der Thermoreaktion verfahren Reinhardt und Murschel folgendermaßen: es wurde eine Anzahl Uhlenhuthscher Gläschen mit je 0,25 ccm des präzipitierenden Paratyphusserums beschickt, die Extrakte der betreffenden Organe je mit besonderer steriler Pipette vorsichtig darüber geschichtet. Gleichzeitig wurden Kontrollversuche mit Normalserum einerseits, andererseits mit Extrakten von Organen gesunder und an andern Krankheiten eingegangener Tiere sowie mit der zur Herstellung der Extrakte verwandten Kochsalzlösung angestellt.

Bei Verwendung hochwertiger präzipitierender Sera traten in den mit den Organextrakten der an Paratyphus verendeten Tiere beschickten Röhren sofort oder innerhalb weniger Minuten

an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeiten deutliche, mehr oder weniger breite, grauweiße oder bläulichweiße, scharf abgesetzte Präzipitationsringe auf, die während einer Beobachtungszeit von 15 Minuten noch an Deutlichkeit zunahmen. Die Reaktion trat in gleicher Weise in den Koch- und in den Chloroformextrakten ein, sie unterblieb in den Kontrollröhrchen mit Organextrakten von gesunden Tieren und mit der benutzten physiologischen Kochsalzlösung bzw. mit normalem Serum an Stelle des Paratyphusserums.

Nur in vereinzelten Fällen entstand in den Kontrollproben nach 10 bis 15 Minuten eine leichte, nicht scharf abgesetzte, mehr wolkige Trübung, die sich von der spezifischen Präzipitation dadurch unterscheidet, daß sie wesentlich später auftritt und nicht oder kaum merklich zunimmt. Die Proben fielen sowohl mit frischem als mit verfaultem oder konserviertem Material gleich eindeutig aus.

Rothacker stellte die Schichtprobe in der Weise an, daß er in kleinen Präzipitationsröhrchen je 0,3 ccm Extrakt mit 0,2 ccm eines frisch gewonnenen Paratyphus B Gärtner-Antiserums unterschichtete. Im Verlaufe von 5 bis 10 Minuten riefen von 6 Seris 3 an der Berührungsstelle einen deutlichen Präzipitationsring hervor. Die Kontrollen mit Kochsalz, normalem Kaninchenserum und analog hergestelltem Extrakt aus nicht infiziertem fauligem Kaninchenfleisch blieben stundenlang vollkommen klar. Negativ fielen auch die Proben aus, die mit Organextrakten von an Typhusinfektion eingegangenen Tieren angestellt wurden.

Nach den vorstehenden Ausführungen ist wohl der Schluß berechtigt, daß die Thermoreaktion auch beim Paratyphus anwendbar und zu diagnostischen Zwecken verwertbar ist. Nach Uhlenhuth und Rothacker wird aber die Methode schwerlich beim Nachweis von Fleischvergiftungen bevorzugt werden, da die bakteriologischen Methoden schneller zum Ziele führen, es sei denn, daß es sich um fauliges Fleisch handelt.

### Anwendung der Thermoreaktion bei Tuberkulose.

Daß die Thermoreaktion auch bei der Tuberkulose diagnostische Verwertung finden kann, geht aus den Untersuchungen von Fagioli hervor.

Fagioli benutzte bei seinen Versuchen, die mit präzipitierendem Tuberkuloseserum von Vallée angestellt wurden, anfänglich Kochextrakte aus tuberkulösem Auswurf, da sich jedoch dabei störende, nicht spezifische Trübungen bemerkbar machten, wurde die Chloroformmethode mit einigen Modifikationen herangezogen. Zwecks Herstellung der Extrakte wurden 5 bis 10 ccm Auswurf mit der doppelten Menge Chloroform versetzt, die Mischung durchgeschüttelt, 3 bis 4 Stunden bei 37° im Brutschrank gelassen, nach Zusatz einer gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung neuerdings 2 bis 3 Minuten geschüttelt, dann durch Filtrierpapier oder besser durch Asbest filtriert.

Zur Anstellung der Schichtprobe benutzte Fagioli 2,5 cm hohe, 3 bis 4 mm weite Reagenzröhrchen. Er beschickte dieselben bis zu halber Höhe ungefähr mit präzipitierendem Serum und überschichtete dasselbe langsam mit Hilfe einer Kapillarpipette mit 2 bis 3 Tropfen Auswurfextrakt. Nach 20 bis 30 Minuten Aufenthalt im Brutschrank oder 30 Minuten bei Zimmertemperatur wurde das Resultat abgelesen, und zwar bei künstlicher Beleuchtung. Die positive Reaktion äußerte sich durch das Auftreten einer deutlichen weißlichen Ringbildung an der Berührungsfläche zwischen Extrakt und Serum.

Mit sicher tuberkulösem, den Kochschen Bazillus enthaltendem Auswurf erzielte Fagioli bei Verwendung unverdünnter Extrakte in allen Fällen positive Reaktion, bei Verdünnung der Extrakte auf  $\frac{1}{2}$  reagierten 95 unter 99, auf  $\frac{1}{5}$  84 von 99 positiv, in einer geringen Anzahl von Fällen waren selbst bei einer Verdünnung auf  $\frac{1}{10}$  noch deutlich positive Reaktionen zu verzeichnen.



Unter 95 Auswürfen ohne Tuberkelbazillen erhielt F a g i u o l i 10 mal mit unverdünnten und 4 mal mit zur Hälfte verdünnten Extrakten positive Reaktionen. Von 11 Auswurfextrakten aus auf Grund der klinischen Erscheinungen als tuberkulös angesprochenen Individuen, in denen jedoch Tuberkelbazillen nicht nachweisbar waren, trat die Ringbildung mit einer einzigen Ausnahme deutlich auf, ein Ausfall, welcher der Thermoreaktion bei der Frühdiagnose der Tuberkulose einen großen Wert zusprechen würde.

Eine Einschränkung erfährt vorläufig die Verwendbarkeit der Thermoreaktion bei Tuberkulose durch die positiven Ausfälle, die zuweilen auch mit nicht tuberkulösem Auswurf auftreten.

Eine genauere Abschätzung dieser Fehlerquelle ist vorläufig nicht möglich, es dürfte jedoch dieser Übelstand bei Verwendung hochwertiger Sera und bei Abkürzung der Beobachtungsdauer wesentlich reduziert werden können.

### Anwendung der Thermoreaktion bei Maltafieber.

Von V i g a n ò wurde in jüngster Zeit die Thermoreaktion auch bei Maltafieber zum Nachweise des spezifischen Präzipitinogens herangezogen.

V i g a n ò wußte sich durch Immunisierung des Pferdes mit dem *M. melitensis* ein brauchbares, momentan präzipitierendes Serum zu verschaffen. Die Kulturfiltrate, denen gegenüber er das Präzipitationsvermögen des Serums ausprüfte, waren durch Aufschwemmung einer 48 stündigen Agarkultur mit 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und zum Teil 5 Minuten im siedenden Wasserbade, zum Teil 24 Stunden im Eisschrank gehalten worden. Die Klärung der Extrakte wurde durch ein- oder mehrmalige Filtrierung durch Asbest bewerkstelligt. Auch das präzipitierende Serum, das zur Vermeidung einer störend wirkenden Opaleszenz nach vorausgegangenem 18 stündigem Hungern des Serumtieres gesammelt wurde, kam nach Zentrifugation völlig klar zur Anwendung.

Bei vergleichender Anstellung der Schichtprobe mit im kochenden Wasserbad und im Eisschrank gehaltenen Kulturextrakten kam es bei ersteren momentan oder fast momentan zum Auftreten der charakteristischen Scheibenbildung, während die Reaktion mit letzteren viel langsamer und schwächer auftrat. Diese Feststellung beweist die Vorzüge der Extraktion des Präzipitinogens durch die Hitze und läßt die Bezeichnung Thermopräzipitin und Thermoreaktion als gerechtfertigt erscheinen.

V i g a n ò überzeugte sich von dem spezifischen Charakter der Thermopräzipitine, indem er die Schichtprobe einerseits mit sämtlichen ihm zur Verfügung stehenden 15 Stämmen des *Micrococcus melitensis* in mehr oder weniger ausgesprochenen, stets aber deutlich positiven Resultaten anstellte, andererseits aber in den Kontrollen mit Kulturfiltraten anderer Keime (Staphylokokken, Streptokokken, Meningokokken, Gonokokken, Typhusbazillen, *B. coli*, Milzbrand- und Rotlaufbazillen) in allen Fällen negative Ergebnisse erzielte. Die charakteristische Ringbildung blieb auch in jenen Fällen aus, in denen an Stelle des präzipitierenden Melitensisserums vom Pferde präzipitierendes Milzbrand- oder Rotlaufserum verwendet wurde.

Die gleichen eindeutigen Resultate wie mit Kulturextrakten des *M. melitensis* erhielt V i g a n ò mit Organen aus Meerschweinchen, die in einem Zeitraume von 7 Tagen einer experimentellen Melitensisinfektion erlegen waren. Die unter Verwendung unserer Kochmethode aus der Milz, der Leber, der Niere, dem Herzen und dem Blute gewonnenen Extrakte wurden in der üblichen Weise mit Serum unterschichtet: es kam hierbei mit Milz- und Leberextrakten sofort, mit Nierenextrakten etwas langsamer zur positiven Reaktion, während dieselbe mit Herzextrakten ausblieb.

### Weitere Ausblicke zur Anwendung der Thermoreaktion.

Außer bei Milzbrand, Rotlauf, Rauschbrand, Fleischvergiftung, Tuberkulose und Maltafieber ist eine Anwendung unserer Thermoreaktion bereits von *H e c h t* bei Typhus, von *U h l e n h u t* bei Schweinepest in Aussicht gestellt. Eine kurze Mitteilung von *F a c c h i n* spricht ferner für ihre Verwendbarkeit an pneumonischem Auswurf.

Es ist schon darauf hingewiesen worden, daß der Thermoreaktion als allgemeiner, serodiagnostischer Methode gelegentlich Bedeutung für die gerichtliche Medizin, für die Nahrungsmittelkunde und Fleischbeschau zukommen kann, z. B. wenn es sich darum handelt, einen Krankheitserreger an bereits beerdigtem Kadaver, in Fleisch- und Organstücken, selbst in konserviertem oder verarbeitetem und erhitztem Zustand nachzuweisen.

Selbstverständlich sind jedoch auch der Leistungsfähigkeit der Thermoreaktion gewisse Grenzen auferlegt.

So haben wir im Kapitel über die Anwendung der Thermoreaktion bei Milzbrand gesehen, daß ihrem absoluten Werte selbst auf diesem ihrem klassischen Arbeitsgebiete durch den geringen Präzipitinogehalt in bestimmten Fällen (Schwein, experimenteller Milzbrand) eine Schranke gesetzt ist. Bei Rotlauf haben wir außer einer Verschärfung dieser Einschränkung in dem Eindringen von Keimen der *Murisepticus*-Gruppe bei Fäulnis der Untersuchungsobjekte eine Fehlerquelle kennen gelernt, die zu besonderer Vorsicht in der Verwertung positiver Ergebnisse an nicht frischem rotlaufverdächtigen Material mahnt. Bei Rauschbrand stand der praktischen Anwendung der Methode an dem Muskel die technische Schwierigkeit der Beschaffung klarer Extrakte störend im Wege, welche von *H e c h t* glücklich überwunden wurde.

Bei der Tuberkulose scheint wiederum in der Eigenart des Untersuchungsobjektes und in der geringen Reaktionsbreite ein Hindernis zu liegen, welches bisher nur teilweise überwunden werden konnte.

Bei den verschiedenen Infektionen, wo die Thermoreaktion Anwendung finden kann, ist nämlich ihr Ausbau nur durch zielbewußtes Vorgehen zu erreichen. Es muß vor allem die Gewinnung der präzipitierenden Sera angebahnt und die Bereitung entsprechender Extrakte ausgearbeitet werden, worauf dann die Einschätzung ihres reellen Wertes durch experimentelle Untersuchungen und an dem Material aus der Praxis einsetzt, wobei ihr Charakter als Gruppenreaktion richtig zu würdigen und die den Spezialfällen eigenen Schwierigkeiten zu überwinden sind.

Unerläßliche Vorbedingungen sind Gewinnung des präzipitierenden Serums und Herstellung entsprechender Extrakte, ohne welche der Reaktion die Grundlagen abhanden kommen. Ob diesen Grundbedingungen in allen Fällen entsprochen werden kann, scheint uns mindestens fraglich: bei seuchenhaftem Verwerfen, wo von *S z y m a n o w s k i* wenig ermutigende Ergebnisse gemeldet wurden, glauben wir die Ursache des Versagens der Thermoreaktion in den Schwierigkeiten

rigkeiten zu erblicken, die der Bereitung entsprechender Extrakte aus der Schwerlöslichkeit der fraglichen Präzipitinogene in Wasser zu entstehen scheinen.

Wenn also das Arbeitsfeld der Thermoreaktion in diesem Sinne nicht als unbegrenzt bezeichnet werden soll, so dürften ihr wiederum auf dem Gebiete der biologischen Reaktionen weitere Bahnen erschlossen werden können.

Daß die Kochextraktion zur Gewinnung nicht nur von präzipitinogenen Substanzen, sondern auch zur Darstellung von Antigenen für die Komplementablenkung dienen kann, war auf Grund der Hitzebeständigkeit von Antigenen, wie Tuberkulin und Mallein, die zur Komplementablenkung dienen können, vorauszusehen: in der Tat haben Pfeiler mit dem Verfahren für die Komplementablenkung brauchbare Antigene bei Rotz (Zeitschrift für Immunitätsf.), Djoubelieff (Rév. Générale des Méd. Vet. Bd. 20) bei Milzbrand hergestellt.

Es will uns scheinen, daß die Thermoreaktion dadurch, daß sie uns tadellose, sterile, eiweißfreie Extrakte aus infizierten Organen zum Studium der biologischen Reaktionen mittels in vivo gebildeter bakterieller Antigene liefert, eine allgemeinere serodiagnostische Methode zu werden verspricht und wohl auch über einen solchen Rahmen hinauszuwachsen berufen sein dürfte.

März 1913.

## Literatur.

### Milzbrand.

A. Ascoli, La precipitina nella diagnosi del carbonchio ematico. La Clinica Veterinaria 1911, Nr. 1. — Derselbe, Les précipitines dans le diagnostic du charbon bactérien. Compt. Rendus Société de Biologie, Séance du 14 février 1911. — Derselbe, Die Präzipitin-diagnose bei Milzbrand. Ztbl. f. Bakt. Orig.-Bd. 58, Nr. 2. — Derselbe, Biologische Milzbranddiagnose mittels der Präzipitinmethode. D. med. Wschr. 1911, Nr. 8. — Derselbe, Diagnosi del carbonchio ematico col metodo della termoprecipitina. La Clinica Veterinaria 1911, Nr. 4. — Derselbe, La precipitina del carbonchio ematico. Pathologica, anno 3, Nr. 56, 1911. — Derselbe, Il diagnosticatore del carbonchio ematico. La Clinica Veterinaria 1911, Nr. 9. — Derselbe, Zur Technik meiner Präzipitinreaktion bei Milzbrand. Berl. tierärztl. Wschr. 1911, Nr. 22. — Derselbe, Les précipitines dans le diagnostic du charbon bactérien. Annales de Méd. Vét. 1911, Nr. 6. — Derselbe, Lo svolgimento della reazione precipitante nel carbonchio ematico. Biochimica e Terap. Sper. anno 3 fasc. 2. — Derselbe, Der Ausbau meiner Präzipitinreaktion zur Milzbranddiagnose. Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 11, H. 1. — Derselbe, La termoprecipitina nel carbonchio ematico. Il corriere dei macelli, anno 2, Nr. 9. — Derselbe, Lo stato attuale della reazione precipitante nel carbonchio ematico. Giorn. R. Soc. Ital. d'Igiene 1911. — Derselbe, Antiblastina e precipitina nel carbonchio ematico. Comunicazione alla seconda Riunione Soc. Ital. di Biochimica, Torino, ottobre 1911. — Ascoli, A., und Valenti, E., Diagnosi biologica del carbonchio ematico. Soc. Ital. di Scienze Nat., Sitzung vom 6. März 1910. Biochimica e Terap. Sper. anno 2, fasc. 3. La Clinica Veterinaria. 1910, Nr. 21. — Dieselben, Biologische Milzbranddiagnose. Ztschr. f. Infektionskrankh. der Haustiere Bd. 7, H. 5/6. — Bierbaum, K., Beitrag zur Milzbranddiagnose mit Hilfe der Präzipitationsmethode. Berl. tierärztl. Wschr. 1911, Nr. 12. — Pfeiler, W., Die Diagnose des Milzbrandes mit Hilfe der Präzipitationsmethode. Berl. tierärztl. Wschr. 1911, Nr. 13. — Derselbe, La diagnosi del carbonchio ematico per mezzo della precipitina. Il Moderno Zootro 1911, Nr. 30. — Derselbe, Der Nachweis des Milzbrandes mittels der Präzipitationsmethode. Berl. tierärztl. Wschr. 1912, Nr. 9/10. — Derselbe, Die Präzipitinreaktion und der Milzbrand des Schweines. Berl. tierärztl. Wschr. 1912, Nr. 25. — Roncaglio, G., Sulla specificità della reazione Ascoli (Termoprecipitina) nella diagnosi del carbonchio ematico. La Clinica Veterinaria 1911, Nr. 10. — Derselbe, Über die Spezifität der Ascolischen Präzipitinreaktion bei verschiedenen Organen. Ztschr. f. Infektionskr. d. Haustiere Bd. 9, Nr. 6. — Derselbe,

Nuovo contributo sperimentale alla conoscenza della reazione Ascoli (Termoprecipitina) nella diagnosi del carbonchio ematico. *La Clinica Veterinaria* 1911, Nr. 20/21. — Derselbe, Neuer Beitrag zur Kenntnis der Ascolischen Reaktion (Thermopräzipitin) zur Milzbranddiagnose. *Ztschr. für Immunitätsforsch. Orig.-Bd.* 12. — Zibordi, D., La conservazione del materiale carbonchioso in rapporto alla diagnosi colla reazione Ascoli (termoprecipitina). *Il nuovo Ercolani* 1911, Nr. 16. — Derselbe, Die Konservierung des Milzbrandmaterials in bezug auf die Diagnose mittels der Ascolischen Thermopräzipitinreaktion. *Tierärztl. Ztbl.* 1911, Nr. 19. — Favero, F., Contributo alla diagnosi del carbonchio ematico colla reazione Ascoli della termoprecipitina. *La Clinica Veterinaria* 1911, Nr. 11. — Derselbe, Beitrag zur Diagnose des Milzbrandes mittels der Ascolischen Reaktion (Thermopräzipitinmethode). *Folia Serologica* Bd. 7, 1911. — Casalotti, A., La termoprecipitina Ascoli nella diagnosi del carbonchio ematico. *Biochimica e Terap. Sper.* anno 3, fasc. 5. — Derselbe, Die Thermopräzipitinmethode bei der Milzbranddiagnose. *Berliner tierärztl. Wschr.* 1911, Nr. 49. — De Gasperi, F., Del sicuro valore della reazione di Ascoli (della termoprecipitina) nella diagnosi del carbonchio ematico. *Giorn. R. Società Naz. Vet. Ital.*, anno 40, 1911. — Derselbe, La réaction d'Ascoli dans le diagnostic du charbon bactéridien. *Revue gén. de Méd. Vét.* 1911, Nr. 214. — Derselbe, Über die Bedeutung der Thermopräzipitinreaktion nach Ascoli für die Diagnose des Milzbrandes. *Ztbl. f. Bakt. Orig.-Bd.* 61, H. 1/2. — Granucci, L., La reazione precipitante nel carbonchio ematico. *La Clinica Veterinaria* 1911, Nr. 16. — Derselbe, Die Ascolische Präzipitinreaktion bei Milzbrand. *Ztschr. f. Infekt.-Kr. der Haustiere* Bd. 10, H. 6. — Lebre, A., Le diagnostic du charbon bactéridien par la réaction précipitante d'Ascoli. *Bulletin Portugaise des Sciences Nat.* t. 5, fasc. 5. — Derselbe, Diagnostico de carbunculo bacteridico pela reacção d'Ascoli. *Archivos do Instituto bacteriologico Camera Pestana, Lisboa* 1911, t. 3, fasc. 3. — Derselbe, Die Diagnose des Milzbrandes mittels der Ascolischen Reaktion. *Ztschr. f. Immunitätsforsch.* Bd. 12, H. 4. — Belfanti, S., Ricerca dell'infezione carbonchiosa nelle pelli col metodo Ascoli. *Congresso dei Conciatori, Torino, settembre 1911.* — Negroni, P., Diagnosi delle pelli carbonchiosi col metodo Ascoli. *Biochimica e Terap. Sper.* vol. 3, fasc. 7. — Floris, G., La termoprecipitina Ascoli nella diagnosi del carbonchio ematico. *Il Moderno Zootro* 1911. — Derselbe, Die Thermopräzipitinreaktion Ascoli bei der Milzbranddiagnose. *D. tierärztl. Wschr.* Jahrg. 20, Nr. 14. — Markoff, N., Zur Frage der Herstellung eines präzipitierenden Milzbrandserums. *Berl. tierärztl. Wschr.* 1911, Nr. 47. — Schuetz und Pfeiler, Der Nachweis des Milzbrandes mittels der Präzipitationsmethode. *Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk.* Bd. 38, H. 3. — Schuetz, Eine neue Methode zur sicheren Feststellung des Milzbrandes und deren Anwendung. *Verh. d. kgl. Landes-Ökon.-Koll.*, Februar 1912. — Ruppert, F., Beitrag zur Ascolischen Präzipitindiagnose bei Milzbrand. *Mitt. d. Kaiser Wilhelm-Inst. zu Bromberg* Bd. 4, H. 3. — Zwick, Eine neue Methode zur Feststellung des Milzbrandes. *Verh. d. Kgl. Landes-Ökon.-Koll.*, Februar 1912. — Hobstetter, Zur Milzbrandpräzipitation. *Berl. tierärztl. Wschr.* 1912, Nr. 7. — Pressler, K., Das Milzbranddiagnostikum Ascoli in der Praxis. *Berl. tierärztl. Wschr.* 1912, Nr. 11. — Profé, Zur Frage der Präzipitationsreaktion als Milzbranddiagnostikum. *Der Tierarzt* 1912, Nr. 11. — Flemming, A., Die Sero-diagnose des Milzbrandes vermittels der Ascolischen Präzipitationsmethode. *Inaug.-Diss., Tierärztl. Hochschule zu Hannover, Deutsche tierärztl. Wschr.* 1912. — Patzewitsch und Isabolinsky, Russky Wratsch 1912, Nr. 18. — Guerrera, S., Sull'influenza della vaccinazione anticarbonchiosa nella termo precipitinazione Ascoli. *Giorn. R. Soc. Naz. Vet.* 1912, Nr. 17. — Leoncini, F., Sulla applicazione della reazione precipitante dell'Ascoli per il carbonchio ematico, nella pratica della medicina forense. *Gazz. Int. di Medicina* 1911, Nr. 50. — Jármai, K., A lépfene diagnózisa az Ascoli-féle termoprecipitáció segítésével. *Allatorvosi Lapok* 1911, 11. Mai. — Fischöder, F., Die Feststellung des Milzbrandes nach dem Verfahren von Ascoli. *Ztschr. f. Infekt.-Kr. der Haustiere* Bd. 12, H. 1/2. — Silva, P., Ricerche sperimentali sulla specificità della reazione Ascoli (termoprecipitina) nella diagnosi del carbonchio ematico. *Corriere dei Macelli*, dicembre 1911. — Derselbe, Contribution à l'étude de la réaction Ascoli dans le diagnostic du charbon bactéridien. *Journal de Méd. Vét. et de Zootechnie*, juin 1912. — Derselbe, Contributuni la Studiul asupra Reactiunii Ascoli in diagnosticul carbunelui bacteridien. *Revista de Medicina Veterinara di Bucuresti* 1912, Nr. 1/2. — Maag, C. G., Contribucion al estudio de los metodos empleados en el diagnostico del carbunculo bacteridiano. *Buenos Aires, Imprenta Suiza.* — Hieronymi, Die Diagnose des Milzbrandes durch die Präzipitationsmethode. *Berl. tierärztl. Wschr.* 1912, Nr. 31. — Szymanowski und Zagaja, Ein Beitrag zur Thermopräzipitation beim Milzbrand. *Ztschr. f. Infekt.-Kr. der Haustiere* Bd. 12, H. 3. — Tomo Triplat, Die Ascolische Thermopräzipitinreaktion beim Milzbrande. *Veterinarski Vijesnik* 1912, Nr. 9. — Canejo, Diagnose do carbunculo bacteridico pela reacção d'Ascoli. *Rivista de Medicina Veterinaria* 1912, Nr. 123. — Oslander, Th., Beiträge zur Diagnose des Milzbrandes mittels der Präzipita-

tionsmethode nach Ascoli. Inaug.-Diss., Kgl. Tierärztl. Hochschule zu Stuttgart, 1912. — Meyer, O., Beiträge zur Diagnose des Milzbrandes mittels Ascolis Thermopräzipitinmethode. Monatshefte f. prakt. Tierheilk. Bd. 24. — Quevado e Maag, La séroprécipitation dans le charbon bactérien. Revista Zootechnica, Buenos Aires, novembre 1912. — Djoubelieff, Diagnostic expérimental du charbon bactérien. Revue gén. de Médecine Vétérinaire Bd. 20, Nr. 239. — Alexejew, Die Präzipitation als Diagnosemittel in der Veterinärmedizin. Arch. f. Vet.-Wiss. Jahrg. 42 (1912), H. 8. — Schieppati, Alcune osservazioni sul comportamento del bacillus anthracis nei pesci. Atti Soc. Ital. di Scienz. Nat. Bd. 51. — Elsässer und Siebel, Lokaler Milzbrand beim Schweine. Ztschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Jahrg. 22, H. 7/8. — Seibold, E., Milzbrand beim Schweine. Zugleich ein Beitrag zur Milzbrandpräzipitinreaktion nach Ascoli. Ztschr. f. Fleisch- u. Milchhyg., Jahrg. 23, H. 7. — Deelich, M., Präzipitation beim Milzbrand und beim Schweinerotlauf. Ztschr. f. Infekt.-Kr. der Haustiere Bd. 12. — Schmitz, Beitrag zur Frage des lokalen Milzbrandes beim Schweine. Ztschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Jahrg. 23, H. 13.

#### Rotlauf.

Ascoli, A., La reazione della termoprecipitina nel mal rosso. La Clinica Veterinaria 1911, Nr. 24. — Derselbe, Die Thermopräzipitinreaktion als allgemeine serodiagnostische Methode. Ihre Anwendung bei der Diagnose des Schweinerotlaufs. Das Thermopräzipitin-diagnostikum. Berl. tierärztl. Wschr. 1912, Nr. 10. — Derselbe, La termoprecipitina e le sue applicazioni. Lettura tenuta nell'associazione Sanitaria Milanese, 26 febbraio 1912. — Derselbe, La reazione della termoprecipitina come metodo generale di sierodiagnosi. Applicazione al mal rosso. Rivista Mens. di Scienze Nat. Bd. 3, idem, Policlinico, Sez. Prat. 1912. — Derselbe, La réaction de la Thermoprecipitine comme methode générale de sérodiagnostic. Application au rouget du porc. Annales de Médecine Vét. 1912 S. 321. — Derselbe, La precipitina del mal rossino. La Clinica Veterinaria 1912, Nr. 18—22. — Silva, P., La reazione Ascoli (termoprecipitina) nella diagnosi del mal rossino. La Clinica Veterinaria 1912. — Derselbe, Die Ascolische Thermopräzipitinreaktion beim Rotlauf der Schweine. D. Tierärztl. Wschr. 1912, Nr. 21. — Iwicki, M., Die Ascolische Thermopräzipitinreaktion als diagnostisches Hilfsmittel beim Rotlauf der Schweine. Berl. tierärztl. Wschr. 1912, Nr. 23. — Raebiger, Protokoll des Vereins der Thüringer Tierärzte. Berl. tierärztl. Wschr. 1912, Nr. 32. — Deelich, M., Präzipitation beim Milzbrand und beim Schweinerotlauf. Ztschr. f. Infekt.-Kr. der Haustiere Bd. 12, S. 434. — Derselbe, Präzipitation bei Schweinerotlauf. Tierärztl. Ztbl. 1912, Nr. 9. — Profé, Protokoll des Vereins Rheinpreuß. Tierärzte, Berl. tierärztl. Wschr. 1912, Nr. 43. — Zagaja, J., Schweinerotlaufdiagnose mittels der Thermopräzipitinreaktion Ascolis. Berl. tierärztl. Wschr. 1912, Nr. 45. — Canejo, A., Diagnostico do Mal Rubro pela reacção d'Ascoli. Dissertação Inaugural, Escola de Medicina Veterinaria, Lisboa 1912. — Isabolinsky und Patzewitsch, Über die Präzipitationsreakt. bei Schweinerotlauf. Ztbl. f. Bakt. Orig.-Bd. 67, H. 4. — Seibold, E., Beitrag zur Feststellung des Rotlaufs der Schweine mit Hilfe der Thermopräzipitinreaktion nach Ascoli. Ztschr. f. Infekt.-Kr. der Haustiere Bd. 13, H. 1/2. — Hecht, Ztbl. f. Bakt. Orig.-Bd. 67. — Gaus, Untersuchungen über die Thermopräzipitation zum Nachweis des Schweinerotlaufs. Inaug.-Diss., Kgl. Tierärztl. Hochschule, Stuttgart 1912.

#### Rauschbrand.

Hecht, V., Die Präzipitindiagnose des Rauschbrands mit einem Beitrag zur Frage der Thermoresistenz der Präzipitinogene. Ztbl. f. Bakt. Bd. 67. — Deelich, Ztschr. f. Infekt.-Kr. der Haustiere Bd. 12.

#### Fleischvergiftungen.

Reinhardt, R., Der Nachweis von Paratyphusinfektionen mit Hilfe der Präzipitationsmethode. Ztschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene 1912, Jahrg. 23, H. 3. — Murschel, W., Untersuchungen über die Verwendbarkeit der Ascolischen Präzipitinreaktion zum Nachweise von Paratyphusinfektionen. Inaug.-Diss., Tierärztl. Hochschule, Stuttgart 1912. — Rothacker, Präzipitation bei Fleischvergiftung. Ztschr. f. Immunitätsforschung Bd. 16, H. 5/6.

#### Tuberkulose, Maltafieber usw.

Fagiuoli, A., Sulla reazione delle termoprecipitine nella tubercolosi. Pathologica 1912, Nr. 89. — Ancora sulla termoprecipitina nella tubercolosi. — Viganò, L., Le termoprecipitine nell'infezione melitense. Clinica Veterin. 1913. — Facchin, A., La precipito diagnosi nelle affezioni da pneumococco di Fränkel. Gazz. degli Osp. 1913, Nr. 45. — Szymanowski, Über die Anwendung der Präzipitationsmethode zur Diagnostik des ansteckenden Verkälbens. Arb. a. d. Kgl. Gesundheitsamte Bd. 43, H. 1.