

## XXII.

## Über das Rauschbrandserum.

(Aus dem Laboratorium des Budapester Impf- und Seruminstutitut *Jenner-Pasteur.*)

Von

Universitäts-Dozent Dr. Ladislaus Dentre,  
Fachleiter des Instituts.

Außer dem wissenschaftlichen Interesse für die noch immer nicht genügend geklärte Rauschbrandserumfrage waren es hauptsächlich praktische Momente, die uns zum Studium dieses Serums angeregt haben. Einmal gehört der Rauschbrand heute noch zu jenen Krankheiten des Rindes, die unseren therapeutischen Eingriffen unzugänglich sind: es mußten daher die Bedingungen der Darstellung eines hochwertigen Heilserums erforscht werden; dann aber sollte das dargestellte Serum dem praktischen Vakzinator eine glatte, sichere Immunisation ermöglichen — ein bisher gleichfalls nicht erreichtes Ziel. Heute unterliegt es keinem Zweifel, daß ein und derselbe Impfstoff an den verschiedenen Tierindividuen ganz verschiedene Resultate zu erzielen vermag. Selbst die allervirulentesten Rauschbrandsproten töten die experimentell infizierten Rinder (Mc. F a d y e a n) nicht konstant, anderseits aber können von entsprechend abgeschwächten Krankheitskeimen nach Abertausenden von Vollerfolgen einmal und wieder schwere, ja tödliche Impfunfälle verursacht werden. Diese Überempfindlichkeit mancher Impfinge kann verschiedene Gründe besitzen: manchmal spielen interkurrente äußere Infektionen, schlechte Ernährungsverhältnisse eine gewisse Rolle, gewöhnlich ist es aber — entsprechend den L e c l a i n c h e s c h e n Lehren — eine latente Rauschbrandinfektion, die jene verhängnisvollen Empfänglichkeiten erzeugt. Die latente Infektion mag einen doppelten Schädigungsmodus bedingen: erstens ist es wohl denkbar, daß es infolge der durch den Impfakt gesetzten negativen Phase zu einem Ausbruch jener Keime kommt, die seit längerer Zeit im Organismus „schlummerten“ bzw. während der Impfperiode aufgenommen wurden. Zweitens mag diese „latente“ Infektion eine solche Verminderung der Widerstandsfähigkeit des Organismus erzeugen, daß der geschwächte Tierkörper dann infolge der Vakzineime direkt infiziert wird.

Gegen diese Gefahren waren wir bisher schutzlos. Die Rauschbrandimpfungen sind nämlich bloß in „Rauschbrandgegenden“ verbreitet: in diesen aber können die Impfinge während der Impfperiode vor einer interkurrenten äu ß e r e n Infektion kaum beschützt werden. Wohl wird vielfach angegeben, daß durch die Vorschrift, die Vakzination solle prinzipiell im Vorfrühling (Februar, Anfang März), wo die Tiere die Ställe noch nicht verlassen, beendigt werden, eine äußere Verseuchung mit Erfolg verhindert wird: doch ist diese Maßregel gewiß bloß von bedingtem Werte. Die Tiere können nämlich, wie uns in zahlreichen Fällen berichtet

worden, auch in ihren Stallungen, wohl durch Ingestion sporenhaltigen Futters, infiziert werden; und dann ist es gang und gäbe, daß die meisten der Tierhalter sich bloß dann zur Vakzination entschließen wollen, wenn sie durch einzelne Rauschbrandfälle bereits die Überzeugung gewonnen haben, daß ihre Weide verseucht ist. Der Sachverständige befindet sich da in einem Dilemma: impft er nicht, gewinnt die Seuche eventuell rasch an Ausbreitung, impft er, gelangen die bisher latenten Infektionen zum Ausbruch oder die Impfung selbst verursacht schwere Impfschäden.

Die bei den Milzbrand- und Schweinerotlaufimpfungen gesammelten Erfahrungen weisen darauf hin, daß die oben ausführlich dargestellten Gefahren mit einem genügend starken, spezifischen Antiserum teilweise behoben werden können. Von einem guten Antiserum ist es nämlich zu erwarten, daß es

1. vor der aktiven Vakzination angewendet, die latenten Infektionen einzämmen kann, so daß die Impflinge nachher die notwendigen Impfreaktionen ohne Schaden vertragen;

2. nach der Vakzination appliziert, jene allzu strengen Impfreaktionen abglätten wird, welche bei — aus irgendwelchen Gründen — überempfindlichen Impflingen zutage treten;

3. die bereits manifest gewordene Krankheit — und zwar natürliche Infektion oder Impfrauschbrand — heilen wird.

An dieser Stelle soll bloß kurz betont werden, daß es uns tatsächlich gelungen ist, ein Antiserum von den erwünschten Eigenschaften darzustellen. Die Darstellung, die Prüfung sowie die spezifischen Qualitäten des Budapester Rauschbrandserums sollen in der vorliegenden Arbeit besprochen werden.

Die Geschichte des Rauschbrandserums reicht auf 20 Jahre zurück. Im Jahre 1893 behandelte der in dieser Frage so verdienstvolle K i t t ein Schaf in Intervallen von 8 Tagen mit je  $2\frac{1}{2}$  ccm eines Rauschbrandfleischsaftes; das Serum dieses Schafes war in der Dosis von 40 ccm imstande, ein anderes Schaf gegenüber der mehrfach letalen Rauschbrandvirusmenge zu schützen. D u e n s c h m a n n (1894) immunisierte Kaninchen gegenüber Rauschbrand und zeigte die spezifisch rauschbrandwidrigen Eigenschaften des Serums der vorbehandelten Versuchstiere. K i t t wies des weiteren (1899) nach, daß außer dem Schafe die Ziege, das Pferd und das Rind zur Hervorbringung des Immunserums in gleicher Weise befähigt sind. Er injizierte virulente Fleischpreßsaft in die Tiere und erzielte ziemlich rasch (z. B. nach 5 bis 10 Injektionen à 10 ccm) ein überaus kräftiges Serum, das in der Dosis von 5 bis 10 ccm die bekannteren sehr empfänglichen Schafe gegen eine nach 3 bis 8 Tagen applizierte, sicher tödliche Virusmenge schützen konnte. Eine weitere Stärkung der Immunität der Serumspender gelang K i t t nicht. Heute wissen wir, warum: weil nämlich die immunisierten Tiere zugleich mit ihrer Rauschbrandimmunität gegen das Muskeleiweiß anaphylaktisch wurden.

K i t t ist auch die erste therapeutische Anwendung des Serums zu verdanken. Bei einer Ziege, die nach einer etwas fehlgegangenen intravenösen Injektion typischen Rauschbrand des perivenösen Bindegewebes zeigte, konnte der Autor mit 15 cem des Serums das Tier binnen einigen Stunden glatt heilen. Daß das Serum auch für die Impfpraxis genügend wirksam ist, zeigte wiederum K i t t, indem er nachwies, daß die Schafe, die einige Tage nach der Seruminjektion das Virus gut vertragen haben, auch einer späteren Infektion gegenüber geschützt sind. In dieser Beobachtung ist der ganze Kern der später von L e c l a i n c h e ausgearbeiteten Serovakzination enthalten.

Die Arbeiten A r l o i n g s bedeuten hauptsächlich eine Bestätigung der K i t t s chen Entdeckungen; sie brachten auch einige neuere Daten betreffs der Serovakzination bei Rindern. Durch L e c l a i n c h e und V a l l é e kam endlich die ganze Frage zu einem gewissen Abschluß. Diese Autoren waren die Ersten, die das Serum mittels Reinkulturen darstellten, und zwar bei Rindern, Ziegen und Pferden. Nach L. ist das Pferd das Rauschbrandserumtier der Wahl. Er injizierte Pferden einige Tage alte Rauschbrandbouillonkulturen in steigenden Dosen (20 bis 150) allwöchentlich; das Serum gewann spezifisch rauschbrandwidrige Eigenschaften. Das L.sche Serum schützt das Meerschweinchen in der Dosis von 1 bis 5 ccm gegen ein  $\frac{1}{2}$  bis 8 Tage später einverleibtes sicher tödliches Virus; auch neutralisiert es das Virus im Mischversuche, nicht dagegen im Falle, wenn das Serum und das Virus zu gleicher Zeit, doch räumlich getrennt injiziert werden. Heilende Wirkungen besaß das Serum nicht.

L e c l a i n c h e s Serum wirkt stark, und zwar spezifisch agglutinierend. Eine Nummer, die den Bac. Chauveau bis zur Titergrenze von 1 : 5000 agglutinierte, war auf den Bac. oedematis maligni auch bei der Verdünnung 1 : 10 unwirksam.

Das Serum spielt eine große Rolle in der von L. und V. eingeführten Impfmethode. Wie bekannt, empfahlen diese Autoren zuerst die auf 65 bis 70° erhitzten Reinkulturen für die Zwecke der praktischen Immunisierung; sie zeigten, daß die gesunden Rinder 1 ccm der mitigierten Reinkultur ohne Schaden zu ertragen vermögen. Werden dagegen verseuchte Herden mit denselben Reinkulturen geimpft, dann sind Ausbrüche der latenten Infektion zu erwarten. In solchen Fällen (verseuchte Bestände) empfahlen L. und V., den Tieren zuerst 15 bis 20 ccm des Serums zu injizieren, und erst in 4 bis 5 Tagen, wenn die latente Infektion voraussichtlich schon eingedämmt, die Injektion des Lebendvirus vorzunehmen.

Unser Arbeitsprogramm basierte auf den L e c l a i n c h e s chen Feststellungen. Das L.'sche Serum schien uns für praktische Zwecke zu schwach zu sein, da es keinerlei therapeutische Wirkungen besitzt und die Schutzdosis (15—20 ccm) auch in der Praxis uns zu hoch erschien; demzufolge trachteten wir ein Serum dazustellen, das den L.schen Höchstwert um ein Mehrfaches übersteigt. Die experimentellen Arbeiten, die teilweise von unseren Institutsbakteriologen, den Herren Dr. G i a c o m o G r o s s o , Dr. V i k t o r H e c h t und L e o p o l d K a l m á r , selbständig durchgeführt wurden, führten zum gewünschten Resultate<sup>1)</sup>.

### 1. I m m u n i s i e r u n g d e s S e r u m s p e n d e r s : Pferd „Arab“.

10. November 1910. 5 ccm einer frischen, 24 Stunden-Leberbouillonkultur, aus unserem Instituts-Rauschbrandstamm gewonnen, dem Pferde in die Jugularyene injiziert. Reaktion = 0.

15. November. 20 ccm einer 20 stündigen Leberbouillonkultur intravenös. Den nächsten Tag geringe Infiltration an der Impfstelle; nach 48 Stunden: glatt.

22. November. 30 ccm der 20 stündigen Kultur intravenös. Reaktion = 0. Das Serum agglutiniert nicht.

29. November. 50 ccm der 48 stündigen Kultur intravenös. Reaktion = 0. Zweite Blutprobe: das Serum agglutiniert bis zu 1 : 40 innerhalb 1 Stunde (mikroskopische Untersuchung).

6. Dezember. 95 ccm der 20 stündigen Kultur, i. v. Reaktion = 0.

13. Dezember. 105 ccm der 48 stündigen Kultur i. v. Sofort nach der Injektion zeigt die Bindehaut des Pferdes eine starke Hyperämie, eine gelbliche Flüssigkeit entleert sich aus den

<sup>1)</sup> Die Resultate dieser Untersuchungen wurden von mir in ungarischer Sprache bereits 1911 in Kürze mitgeteilt, da die wichtigsten Untersuchungen in diesem Jahre zu einem vorläufigen Abschluß gelangten.

Nüstern, die Atmung wird oberflächlich, sakkadiert und beschleunigt, und die ganze Haut trieft vor Schweiß. Diese bedrohlichen Symptome (offenbar eine anaphylaktische Attacke) schwinden allmählich binnen 30 Minuten. Die Temperaturerhöhung des Tieres betrug  $0,5^{\circ}$  C. Dritte Blutprobe: Agglutinationstiter = 0.

20. Dezember. 100 ccm der 20 stündigen Leberbouillon i. v. Dieselben Symptome als am 13. Dezember. Temperaturerhöhung während des Anfalles:  $0,9^{\circ}$  C. Vierte Probe: Titer = 1 : 80.

3. Januar 1911. 100 ccm der 24 stündigen Leberbouillon i. v. Reaktion = 0.

10. Januar. 125 ccm der 24 stündigen Leberbouillon i. v. Reaktion = 0. Fünfte Probe: Titer = 0.

17. Januar. 150 ccm der 24 stündigen Leberbouillon i. v. Reaktion = 0. Sechste Probe. Agglutination: nach 1 Stunde: Titer 1 : 80; nach 2 Stunden Beobachtung: 1 : 160  $\pm$ .

24. Januar. 150 ccm der 24 stündigen Leberbouillon i. v. Sofort nach der Injektion profuse Diarrhoe. Siebente Probe. 1 : 80 nach 1 Stunde schwach, 1 : 160 nach 2 Stunden.

31. Januar. 50 ccm der 4 tägigen (doch sporenfreien) Leberbouillon. Achte Probe: 1 : 80 in 60' positiv; 1 : 160 in 2 Stunden positiv.

Das Serum besitzt bereits eine antiinfektiöse Kraft, denn das Serumtier (behandelt mit 4 ccm) überlebt die Kontrolle mit  $5\frac{1}{2}$  Tagen.

11. Februar. 100 ccm der 6 tägigen Leberbouillon. Neunte Probe: 1 : 400 in 3 Stunden ausdrücklich positiv.

Das Serum ist im Tierversuch nicht wirksam; die intraperitonäale Injektion von 3 ccm sowie 2 ccm im subkutanen Mischversuch: schützen nicht.

21. Februar. 100 ccm der 3 tägigen + 50 ccm der 10 tägigen Kultur. Diarrhoe. Zehnte Probe: 1 : 1000 in 3 Stunden.  $\pm$ .

Da die Leberbouillonkulturen (infolge der kurzen Lebensdauer der einzelnen Bazillen) anscheinend wenig wirksame Antigene lieferten, gingen wir zur Benutzung der Leber s t ü c k bouillon über. Die Rauschbrandbazillen wurden in diesen, entsprechend den T a r r o z z i schen Angaben hergestellten Medien so lange kultiviert, als die überwiegende Mehrzahl der Keime versport war, sodann wurde nach gehöriger Aufschüttelung bis zur Absetzung der Leberpartikel gewartet, und die sehr stark getrübte Kultur injiziert. Die von nun an (auch heute) benutzten Rauschbrandkulturen waren stets solche aërob kultivierte „Leberstückbouillon“kulturen.

28. Februar. 50 ccm 4 tägige Kultur i. v. Reaktion = 0.

11. März. 25 ccm 15 tägige } 50 ccm 6 tägige } Kultur i. v. Zwölftes Probe (Nr. 444).

Die mittels dieser Probe angestellten Versuche wiesen eine überaus starke spezifische Kraft des Serums nach. Für die agglut. Versuche erkannten wir die 30 stündige Kultur als die geeignetste; arbeitet man nämlich mit jüngerer, noch stark fermentierender Kultur, dann stören die stetig sich bildenden Gasblasen die Flockenbildung; in älteren Kulturen hingegen stört die spontane Sedimentierung der Bazillen, die ihre Beweglichkeit eingebüßt haben, die Beurteilung des Agglutinationsvorganges. Bemerkt sei noch, daß die Versuche stets bei  $37^{\circ}$ , in kleinen Eprouvetten, angelegt waren. Folgende Tabelle zeigt das Agglutinationsvermögen der Probe Nr. 444:

1 : 200	in 10' vollständige Auflösung,
1 : 500	
1 : 1000	in 30' „ „ „
1 : 2000	
1 : 4000	in 1 Stunde vollständige Auflösterung,

- 1 : 10 000 in 1  $\frac{1}{2}$  Stunden agglutiniert, in 8 Stunden Flocken, doch klärte sich die Bouillon nicht vollständig,  
 1 : 20 000 in 5 Stunden sichere Agglutination.

Grenztiter = 4000.

Daß das Serum spezifische Agglutinine enthält, konnte an unseren Oedema malignum-Stämmen, sodann an unseren andern, teilweise als „fraglich“ angesprochenen Rauschbrandstämmen nachgewiesen werden. Das Rauschbrandserum erwies sich in diesen Versuchen, über die Herr Dr. Grosso an anderer Stelle ausführlich berichtete, als das heute zur Verfügung stehende sicherste Diagnostikum des Rauschbrandbazillus, indem wir mit Hilfe dieses Serums die Zugehörigkeit der einzelnen Stämme mit der größten Leichtigkeit in einigen Minuten zu erkennen vermochten. Das obige Serum (Nr. 444) agglutinierte zum Beispiel unseren Ödemstamm auch bei 1 : 10 - Verdünnung überhaupt nicht. Dagegen wurde u. a. ein aus rauschbrandverdächtigem Rindfleisch gezüchteter, aber für das Meerschweinchenganzapathogener, demnach absolut atypischer Stamm bis zum Grenztiter agglutiniert und so als Rauschbrand identifiziert. (Ein von Herrn Dr. Grosso aus Kaninchen gewonnenes agglutinierendes „Ödemserum“ zeigte analoge, natürlich reziproke Eigenschaften, indem es den Rauschbrand ganz unbeeinflußt ließ.) An der Hand dieser Versuche, auf deren prinzipielle Wichtigkeit hier noch einmal hingewiesen sein mag, ist es von nun an eine Leichtigkeit, avirulente oder sonst atypische Rauschbrandstämme von rauschbrandähnlichen Keimen sicher auseinanderzuhalten.

Oben erwähnten wir, daß das Leclainche'sche Rauschbrandserum bis zum Titer von 1 : 5000 agglutinierend war; unserem Serum Nr. 444, dessen Kraft bis zu 1 : 20 000 reichte, müßte demnach eine den Leclainche'schen Angaben entsprechende antiinfektiöse Kraft zukommen.

Versuchstier Nr. 125. 200 g. Meerschweinchen erhält 3 ccm Serum subkutan; den nächsten Tag 0,15 Kultur in den Schenkelmuskel: tot in 48 Stunden. Typischer Rauschbrandbefund.

Meerschweinchen Nr. 126. 200 g Kontrolle: tot in 20 Stunden. Typischer Befund.

Das negative Resultat dieses Versuches mußte in den ungünstigen Verhältnissen des Experimentes eine Erklärung finden. Die Leclainche'sche Methode (Serum subkutan, sodann in 24 St. Virus intramuskulär) kann heute nicht mehr als rationell angesehen werden. Die Theorie der Immunität lehrt ja heute, daß die Antikörper auf nichts anderes wirken als auf ihre entsprechenden Antigene, demzufolge widerstrebt es unseren heutigen Kenntnissen, das Serum vor der Infektion dem Tiere einzuverleiben und nun zu warten, bis die resorbierten Antikörper allmählich an den Infektionsherd gelangen: wenn die Mischung „Serum + Virus“ auch außerhalb des Tierkörpers (vor der Infektion) vonstatten gehen kann. Daß die Leclainche'sche Titrierungsmethode auf dem Prinzipie der zeitlich und räumlich getrennten Injektion von Serum und Virus sich aufbaute, mag seine Erklärung in der Tatsache finden, daß zur Zeit seiner ersten Rauschbrand-

arbeiten die französische Schule noch an irgendwelche, den ganz Tierkörper betreffende Serumwirkung glaubte, weshalb es auch ganz logisch schien, den Organismus mit den Antikörpern zu „imprägnieren“, bevor man die eigentliche Infektion vornahm. Heute, bei den bekannten quantitativen Relationen zwischen Antigen und Antikörper, erachten wir bloß jene Titrationsmethoden als logisch aufgebaut, die — wenn es nur statthaft — mittels direkter Mischungen von Antigen + Antikörper arbeiten. Wir erinnern an dieser Stelle u. a. an die Wertbestimmungsmethoden des Schweinerotlaufserums, die an Exaktheit den bekannten Antitoxinbestimmungsmethoden wenig nachstehen.

Gleich unsere ersten Versuche ergaben ganz regelmäßige Schutzbefunde. Zum Beispiel:

Meerschweinchen Nr. 433. 400 g schwer, erhält eine Mischung von 3 ccm des 444. Serums + 0,15 Virus (7 tägige Leberstückbouillonkultur). Die Mischung stand 15' bei Zimmertemperatur, damit die Verankerung der Antikörper wohl stattfinde, dann wurde dieselbe, in 2 Teile geteilt, dem Tiere in beide Schenkel injiziert.

Resultat: reaktionlos. Das Tier bleibt am Leben.

Meerschweinchen Nr. 134, 450 g, als Kontrolle. Statt des Serums 3 ccm Bouillon 0,15 Virus; sonst wie Tier Nr. 133.

Resultat: tot in 24 Stunden. Typischer Rauschbrandbefund.

Diesen Prüfungsmodus behielten wir bis heute bei; der einzige Unterschied ist, daß wir heute, wo die rauschbrandfeindliche Kraft des Serums viel größer ist und wir dementsprechend vom Serum in den Prüfungsversuchen bloß Zentigramme benötigen, die Mischung nicht in zwei Teile geteilt injizieren, sondern in toto verwenden.

Als antiinfektiösen Titer des Rauschbrandserums bezeichnen wir jene geringste Serummenge, die eine in 36 bis 40 Stunden tödliche Virusmenge im Mischversuch und bei intramuskulärer Zufuhr glatt zu neutralisieren vermag.

Die Austitrierung des obigen Serums Nr. 444 ergab folgendes Resultat:

Nr. 136, 200 g Mschw.: 2 ccm Serum (mit 1% Diaferin konserviert) + 0,15 Virus = lebt  
 Nr. 135, " " : 1 ccm " " " + 0,15 Virus = lebt  
 Nr. 138, " " : 0,5 ccm " " " + 0,15 Virus = lebt  
 Nr. 139, " " : 0,1 ccm " " " + 0,15 Virus = tot  
 in 48 Stunden

Nr. 137, 250 " " als Kontrolle: 1½ ccm 1% Diaferin Lösung + 0,15 Virus = tot  
 in 32—35 Stunden.

Die am 23. März entnommene Blutprobe ergab folgende Daten (Serum Nr. 446):

Agglutination: 1: 1000 = in 30' komplette Aggl.  
 1: 5000 = in 30' starke Aggl., in 3 Std. vollständig sedimentiert,  
 1: 10000 = in 3 Std. starke Aggl.,  
 1: 20000 = in 3 Std. starke Aggl.,

Schutzwert: Nr. 138 bis 500 g Mschw.: 2 ccm Serum + 0,25 Virus = lebt,  
 (nicht austitriert) Nr. 139 bis 450 g Mschw.: 2 ccm Bouillon + 0,25 Virus: tot in 32—36 Std.

Die am 30. März entnommene Blutprobe (Nr. 447) ergab als Agglutinationswerte:

1 : 2 000 = in 15' totale Agglutination;

1 : 5 000 = in 15' starke, in 15' fast totale Agglutination;

1 : 10 000 = in 15' keine, in 45' sehr starke, in 1½ Stunden fast komplett Agglutination.

Das Serumpferd steht seitdem ununterbrochen unter Beobachtung; es lieferte innerhalb einiger Wochen (bis Ende April 1911) bereits ein überaus starkes Serum, das den Titerwert von 0,005 bis 0,01 erreichte. Seither wurde es ungefähr alle 2 Monate mit intravenösen Nachimpfungen von 50 bis 100 ccm behandelt, und das Serum behielt seinen hohen, bisher durch keinen Serologen auch annähernd erzielten Hochwert mit geringfügigen Schwankungen bei. Die folgende Zusammenstellung wird die Beständigkeit des Serums klar beweisen; bemerkt sei, daß wir seit ungefähr 2 Jahren mit einem starken Virus arbeiten, von dem 0,02 bis 0,05 bereits die in 36 Stunden tödliche Menge repräsentieren.

Jahr u. Monat	Serum Nr.	Komplette Agglutination	Schutztiter	Virusmenge
1911. X.	477 + 478	1 : 10000 nach 30'	0,01	0,02
			0,02	0,05
" XII.	486 + 488	1 : 10000 " "	0,01	0,05
	485 + 487	1 : 20000 " "	0,01	0,05
1912. I. u. IV.	491 + 504	1 : 10000 nach 10'	0,02	0,02
	505 + 507	1 : 10000 " "	0,01	0,02
	508	1 : 100 nach 4 St.	0,01	0,02
	510 + 511	1 : 1000 nach 1 St.	0,02	0,01
	512	1 : 20000 nach 30'	0,01	0,02
	513 + 514	1 : 200000 !! (30')	0,01	0,02
	520	1 : 20000 in 30'	0,01	0,03
	521 + 522	1 : 20000 in 30'	0,02	0,03
	525	1 : 200000 in 10'	0,05	0,03
	528	1 : 200000 in 10'	0,01	0,03
	529 + 530	1 : 200000 in 10'	0,01	0,03

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß wir das Serumtier unschwer auf dem Serumhöchstwert erhalten konnten; gleichzeitig erhielt sich der Agglutinationstiter ziemlich hoch. Zwischen den beiden Werten ist keine Kongruenz vorhanden; ein schwach agglutinierendes Serum (Serum Nr. 508) mag im Schutzwert den höchstagglutinierenden (z. B. Nr. 578) gleichkommen. (Beiläufig bemerkt, besaßen einzelne Serumnummern einen ganz außerordentlich scheinenden, doch mittels der Kontrollen als sicher erwiesenen Agglutinationswert; vgl. Nr. 505 + 507, sodann 525 bis 530.)

Die Regelmäßigkeit unserer Titrermethode ließ nichts zu wünschen übrig; im Laufe der über viele Hunderte von Versuchstieren sich erstreckenden Auswertungen kam es im ganzen vielleicht drei- bis viermal vor, daß Tiere mit geringeren Serumengen am Leben blieben, wo ein höheres Serumquantum keinen kom-

pletten Schutz auslöste: in solchen Fällen wiederholten wir die Reihe, die dann stets ein rationelles Ergebnis zeitigte. Bei der bemerkenswerten Konstanz des Rauschbrandvirus — die eine natürliche Folge der Konstanz ihrer Komponenten: Sporen + Gifte bildet —, war die Schutzbestimmung desto leichter, als ein und dasselbe Virus, in Phiole eingeschmolzen, wochen-, ja monatelang in der gleichbleibenden Menge als Kontrollvirus angewendet werden konnte.

### Über die Wirkungsweise des Serums.

Unser Rauschbrands serum ist als ein bakterizides zu erachten. Diese Tatsache konnte mit Leichtigkeit erkannt werden. Stellten wir nämlich behufs Agglutinationstiterung die gewöhnliche Verdünnungsskala ein, fiel es bereits in unseren ersten Versuchen auf, daß — bei hochwertigen Seren — die Agglutination in den ersten Röhrchen nicht so lange bemerkbar war, als in den stärkeren Verdünnungen. Bei Seren z. B., deren Agglutinationstiter bei 1 : 20 000 liegt, werden die Röhrchen 1 : 10 oder 1 : 50 bereits nach 2 bis 3 Stunden wieder fast klar, wo die Röhrchen 1 : 1000 oder 1 : 10 000 komplett Ausflockung zeigen. Wir dachten zuerst, daß es sich um ein Aufgelöstwerden des gebildeten Präzipitats im überschüssigen Serum handelt, wie dies für viele Präzipitate bekannt ist, doch zeigte die mikroskopische Untersuchung, daß sich hierbei eine sehr klare Bakteriolyse abspielt. Wird nämlich eine derart fast aufgehelle Serum- + Kulturprobe am Objekträger mit Löfflers Blau gefärbt, dann zeigt sich, daß die Bakterien ihre Färbbarkeit fast vollständig eingebüßt haben. Man sieht Übergänge von spärlichen, noch wohl färbbaren Stäbchen zu polgefärbten oder bloß gefärbte, unregelmäßig geformte Schollen zeigenden Bazillen; endlich bemerkt man ungefärbte oder bloß blaßblau tingierte Hüllen, die bloß mittels Fuchsinnachfärbung als solche sicher erkannt werden.

Diese Bakteriolyse stellt sich nach Benutzung eines frischen Serums am raschesten ein, doch kann dieselbe auch mittels alter, z. B. mit Diphtherin konservierter Seren, wann immer in vitro dargestellt werden, wenn man dem Serum etwas frisches Meerschweinchenserum zusetzt. Diese Tatsache weist aber darauf hin, daß die bakterizide Wirkung des Rauschbrands serum in dem Bordettschen Typus entspricht. Durch Bindungsversuche läßt sich leicht zeigen, daß das Rauschbrandserum einen sich in typischer Weise an die Bazillen verankernden und hernach mit Hilfe des Komplements wirksamen Ambozepter besitzt.

Die Bakteriolyse spielt aber im Meerschweinchenversuch gar keine Rolle. Der Schutz ist nämlich auch für solche Virus ausgesprochen, die — als alte, versportete Kulturen — fast gar keine lebensfähigen Bazillen mehr enthalten, sondern neben abgestorbenen Bazillenleibern — und natürlich den gelösten Produkten — bloß aus lebensfähigen, freien Sporen bestehen. Trotz darauf hingerichteter Untersuchungen konnte nur eine sporizide Wirkung des Serums nicht nachgewiesen werden. Demzufolge müs-

sen im Tierkörper andere Wirkungen zur Geltung kommen als die direkte Bakterizidie. Diese Wirkungen können *in vivo* in direkter Weise nachgewiesen werden, indem man die Infektionsstelle etwa 6 bis 8 Stunden nach der Injektion pungiert und die mittels Kapillaren entnommene rötliche Flüssigkeit auf Sporen färbt. Man erhält die schönsten Phagozytosebilder: in manchen Leukozyten sieht man bis zu 5 bis 6 eingeschlossene Sporen, die sich vom blauen Zelleib leuchtendrot abheben. Das Bild ist ein ähnliches, wie es von *Vaillard* und *Vincent* in ihren bekannten Tetanusstudien zum ersten Male beschrieben wurde, als „Phagozytose der toxinfreien, gewaschenen Sporen“.

Das weitere Schicksal der phagozytierten Sporen wurde von uns nicht verfolgt: es würde sich gewiß lohnen, durch entsprechende Versuche nachzuweisen, ob es in unserem Falle zu einer ähnlichen Verschleppung und Deponierung der Sporen in den bekannten phagozytären Organen (Milz, Knochenmark, wohl auch Leber) kommt, wie dies betreffs der künstlich giftfrei ausgewaschenen Tetanussporen von der französischen Schule gezeigt wurde. Einzelne Beobachtungen weisen darauf hin, als ob die Sporen bloß allmählich abgetötet werden; in der Tat sahen wir einigemal rätselhafte, tödliche Rezidive nach 10 bis 20 Tagen, mit negativem lokalen Befund, einigen charakteristischen Keimen an der unteren Leberoberfläche und sehr starker Kachexie, die bloß durch ein Wiedererwachen der verschleppten Keime zu erklären sind.

Unser Rauschbrandserum bedingt im Meerschweinchenkörper unzweifelhaft eine Förderung der Phagozytose. Wie kommt nun diese Wirkung zustande? Allenfalls durch Neutralisation von gelösten Stoffen, die als Träger der Giftwirkung die Phagozytose sonst behindern. Als solche Stoffe kommen in Betracht: a) Säuren, hauptsächlich Milchsäure; b) gelöste, giftige Proteinstoffe; c) echte Toxine, von Schattenfröh-Graßberger schem Typus. Da die mittels Sodalösung neutralisierte Kultur<sup>1)</sup> durch das Serum in demselben Mengenverhältnis beeinflußt wird, als die native Kultur, kann der Angriffspunkt der Serumwirkung bloß in den giftigen Proteinen und echten Toxinen gesucht werden. Diese Erwägungen führten uns zu der Fragestellung, ob die löslichen Kulturprodukte überhaupt von unserem Rauschbrandserum beeinflußt werden?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde unsere Testkultur scharf abzentrifugiert und mit dem Serum in wechselnden Mengenverhältnissen versetzt. Gleich die ersten Versuche führten zur Erkennung einer stark präzipitierenden Wirkung des Serums. Dies Präzipitiervermögen, das übrigens von Herrn Dr. V. Hecht in einer Sonderarbeit (Ztbl. f. Bakt. 1913) eingehend untersucht und beschrieben wurde, ist nicht bloß den nativen Kulturprodukten, sondern auch den

<sup>1)</sup> Die in Leberstückbouillon gewachsene Rauschbrandkultur reagiert stark sauer. 100 ccm Kultur besitzen einen Säuregrad, entsprechend 7 bis 8 ccm normal Salzsäure. Durch Neutralisation mittels Lauge oder Soda erhöht sich der Dosis letalis-Wert ganz beträchtlich, was auf die pathogenitätfördernde Wirkung der Säure klar hinweist.

auf 100° erhitzten Kulturextrakten sowie Kochextrakten aus frischem sowie getrocknetem rauschbrandigem Muskelfleisch, endlich Kochextrakten aus den sogenannten Lyoner Vakzinen gegenüber spezifisch wirksam. Durch die Siedehitze kommt es allerdings zu einer bedeutenden Verminderung der wirksamen Präzipitinogene, so daß der Schnittversuch — zur Demonstrierung der „Thermo-präzipitine“ im Sinne *Ascolis* — mit Kochextrakten bloß mit unverdünntem oder einhalb verdünntem Serum wohl gelingt, wo mit überhitzten Filtraten auch auf  $1/5$  oder  $1/10$  verdünnte Seren innerhalb einiger Minuten Anlaß zu einer prächtigen Ringbildung geben.

Wie man der partiellen Kochbeständigkeit der Präzipitinogene bzw. der Wirksamkeit des Rauschbrandserums gegenüber den bei 100° noch in Lösung bleibenden Kulturstoffen gegebenenfalls nachforschen soll, ist aus folgender Tabelle ersichtlich.

Material	Herstellungsweise des Extrakts	Überschichtet mit:	Resultat
48stündige Leberstück-bouillon	5' bei Siedehitze, dann durch feuchte „Barytfilter“ bis zur Klarheit filtriert.	$1/1$ Serum	in 2' ++
Altes, trockenes (gepulvertes) Rauschbrandfleisch	$1/2$ g in 10 ccm 1% NaCl-Lösung 5' bei Siedehitze erhitzt, dann wie oben	$1/5$ Serum $1/1$ Serum	in 10' + in 10' +
Trockenes „Lyoner Vakzin“	Gepulvert, dann $1/2$ g in 10 ccm 1% NaCl-Lösung 5' erhitzt etc.	$1/5$ Serum $1/1$ Serum $1/5$ Serum	in 60' ± in 10' + in 60' —

Die spezifische Affinität zwischen den koktostabilen Rauschbrandstoffen und den Präzipitininen des Rauschbrandserums ist mit diesen Versuchen klar erwiesen. Da aber Rauschbrandkulturen trotz länger dauernder (z. B. 2 bis 3 Stunden bei 75°) Erhitzung ihre Pathogenität beibehalten, muß — bei der bekannten Labilität der echten Toxine — es als wahrscheinlich gelten, daß es nicht Toxine sein können, von denen die pathogenen Fähigkeiten einer Rauschbrandkultur abhängig sind. Vielmehr muß man annehmen, daß die Pathogenität in innerem Zusammenhang mit den von uns im Präzipitationsversuch nachgewiesenen, nicht bloß thermo-, sondern (wenigstens partiell) auch koktostabilen, proteinartigen Stoffen steht: und in der spezifischen Beeinflussung dieser giftigen Proteine liegt u. E. das ganze Wesen der Serumwirkung.

Die Affinität der adäquaten Antikörper zu den gelösten Kulturstoffen kann auch mittels der Komplementbindungs methode dargetan werden. Wir arbeiteten stets mittels jener Kapillarmethodik, die ich seit Jahren für derartige Versuche anwende und die ich in meiner Syphilisarbeit (Wien. klin. Wschr. 1908) ausführlich beschrieben habe.

Ein diesbezügliches Protokoll soll die Bindungsverhältnisse in tabellarischer Form vorführen.

Versuch am 20. Juli 1913. Seren Nr. 472 (Titer = 0,01), Nr. 456 (Titer = 0,02), Nr. 464 (Titer = 0,03). Komplement: frisches Meerschweinchenserum „Antigen“: ganz blank zentrifugierte alte Kultur, auf  $1/10$  mit Bouillon verdünnt; nach 1 Stunde bei  $37^\circ$  wurden die Gemische mittels „Kaninchenserum contra Pferdeblut“ auf freies Komplement geprüft. Die Hämolsindosis war stets: die in 10' bei  $37^\circ$  total hämolsierende Menge. Die Abmessung der zu vermengenden Quantitäten geschah mit der von mir angegebenen, winkelartig gebogenen, gedichten Pasteur-pipette, deren ein Teilstück 0,01 ccm entsprach. Die benutzten Eprouvetten sind 15 mm lang, mit einer lichten Weite von 3 mm.

Die allgemeine Formel des Versuchs ist folgende:

5 Cl Na-Lösung + 2 Antigen + 2 Serum + 1 Komplement

1 Stunde bei  $37^\circ$ , dann Hämolsin + Pferdeblutkörperchen.

Das Resultat ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Serum	$1/4$	$1/2$	$1/1$	$2/1$	Komplement-bindungs-grenztiter
472 (Titer <sup>1)</sup> 0,01)	Spuren von Lyse	0 Lyse	0 Lyse	0 Lyse	$> 1/2$
456 (Titer 0,02)	starke Lyse	Spuren von Lyse	0 Lyse	0 Lyse	1
464 (Titer 0,03)	Komplette Lyse	sehr starke Lyse	sehr starke Lyse	0 Lyse	2
1) Kontrolle: Rotlaufserum	Komplett	Komplett	Komplett	Komplett	0
2) Kontrolle: Doppelte Antigenmenge	Komplett				

Besondere Versuche zeigten die absolute Spezifität des Komplementbindungsvermögens. Obige Tabelle zeigt auch eine bemerkenswerte Parallele zwischen — durch Tierversuche ermitteltem — Schutzwert und Komplementbindungsvermögen, die vielleicht, wenn das Vergleichsmaterial umfangreicher wird, zu einer einfachen und in vitro durchführbaren Wertbestimmungsmethode des Rauschbrandserums führen wird.

Das Budapester Rauschbrandserum sei hiermit der Öffentlichkeit übergeben. Aufgabe der Fachmänner ist es, einerseits die hier mitgeteilten theoretischen Befunde zu überprüfen, anderseits aber Schutz- und Heilversuche in der Praxis anzulegen, um festzustellen, ob das Serum den in den einleitenden Sätzen niedergelegten Anforderungen entspricht. Über unsere diesbezüglichen günstigen Erfahrungen werden wir in einer veterinärwissenschaftlichen Fachschrift berichten.

#### Schlußsätze.

1. Durch intravenöse Immunisierung des Pferdes mittels Rauschbrandkulturen ist ein hochwertiges Serum zu erzielen.

<sup>1)</sup> Schutztiter: im Meerschweinchensversuch festgestellt.

2. Das Serum enthält Agglutinine, die bis zu sehr hohen Verdünnungen die Rauschbrandbazillen in spezifischer Weise agglutinieren. Die Spezifität kann zur Identifizierung der Rauschbrandbazillen benutzt werden.
3. Das Serum enthält spezifische Präzipitine, welche die gelösten Kulturproteine ausflocken. Diese Proteine sind teilweise koktostabil.
4. Das Serum ist stark bakterizid; die bakteriziden Stoffe entsprechen dem komplexen Typus (Ambozeptor + Komplement). Die Bakterizidie spielt sich unter dem mikroskopischen Bilde der Lyse ab. Sporen werden nicht aufgelöst.
5. In geeigneten Dosen mit der letalen Kulturmenge gemischt, wird das Virus vollständig neutralisiert. Die erzielten stärksten Sera besaßen einen Schutztiter von 0,005 bis 0,02 ecm, wobei als Schutztiter jene kleinste Serummenge bezeichnet wurde, die mit der in 36 bis 40 Stunden bei intermuskulärer Zufuhr für Meerschweinchen sicher tödlichen Kulturmenge gemischt, dieselbe neutralisiert.
6. Dieses Schutzvermögen wird nicht durch Bakteriolysine bedingt, da das Serum auch gegen alte, vollständig versportete Kulturen wirksam ist. Vielmehr ist es anzunehmen, daß durch das Serum gelöste, proteinartige, giftige Kulturstoffe niedergeschlagen, bezw. neutralisiert werden. Diese Stoffe, als thermostabile und teilweise koktostabile, können *nicht* echte Toxine sein.
7. Mit gelösten Kulturstoffen vermengt, vermag das Serum das Komplement in spezifischer Weise zu binden. Dieses Vermögen ist dem Schutzwert annähernd parallel.

### XXIII.

## Über Veränderungen der Knochen bei Infektionskrankheiten im Kindesalter.

(Aus dem Pathologisch-anatomischen Institute Nr. II in Budapest.)

Von

Dr. A. Fehér.

(Hierzu 8 Textfiguren.)

Nachfolgende Untersuchungen, welche ich an Knochen von an Infektionskrankheiten verstorbenen Kindern anstellte, bezweckten die pathologischen Veränderungen, die bei diesen Krankheiten auch in den Knochen sich abspielen, festzustellen und namentlich zu untersuchen, ob diese Veränderungen überhaupt und inwiefern mit der Rachitis Beziehungen haben.

Daß die Infektionskrankheiten auch in den Knochen Veränderungen hervorrufen, ist schon lange bekannt. Die chronologische Anführung der gesamten diesbezüglichen Literatur soll hier unterlassen werden.

Erwähnt seien nur von den älteren Untersuchungen die von Chiarì, der bei Variola auch in den Knochen Entzündungsherde und Nekrosen fand und die er für spezifisch hielt.