

## Untersuchungen über Schutzimpfungen gegen Horse-Sickness (Pferdesterbe).<sup>1)</sup>

Von  
R. Koch.

B u l u w a y o, den 7. Februar 1904.

Es ist eine in Südafrika allgemein bekannte Tatsache, daß Pferde, welche die Horse-sickness überstanden haben, von der Krankheit nicht wieder oder nur in einer sehr milden Form befallen werden. Solche Tiere werden als „gesalzen“ bezeichnet, d. h. sie haben auf natürlichem Wege eine mehr oder weniger starke Immunität erlangt. Es lag natürlich nahe, zu versuchen, den Pferden auch auf künstliche Weise diese Immunität zu verschaffen und damit die ungeheuren Verluste, welche die Horse-sickness in Südafrika verursacht, zu verringern oder womöglich ganz zu beseitigen. Zu diesem Zwecke sind seit einer Reihe von Jahren von verschiedenen Experimentatoren zahlreiche Untersuchungen gemacht. Es ist auch gelungen, hier und da einige Pferde zu immunisieren. Aber leider konnte bisher kein Verfahren gefunden werden, welches geeignet gewesen wäre, künstlich die Immunität ohne zu große Verluste zu erreichen.

Seitdem es gelungen ist, die Rinderpest mit Hilfe von Serum erfolgreich zu bekämpfen, hat man sich namentlich dieser Richtung zugewandt, und man hat auch insofern Erfolge gehabt, als es gelang, ein Serum zu erhalten, welches deutliche Schutzwirkung besaß. Aber dieses Serum hatte zugleich die höchst unangenehme Eigenschaft, daß es bei den Tieren, welchen es eingespritzt wird, eine Hämoglobinurie erzeugt, woran dieselben meistens zugrunde gehen. Alle Bestrebungen zur Auffindung eines guten Schutzverfahrens sind also bisher sehr unbefriedigend geblieben. Deswegen braucht man aber doch die Hoffnung auf einen schließlichen Erfolg nicht aufzugeben. Die Wissenschaft schreitet beständig fort; es werden immer neue Methoden der künstlichen Immunisierung gefunden und die alten verbessert. Man muß deswegen immer wieder von neuem diese wichtige Aufgabe in Angriff nehmen und versuchen, dieselbe zu lösen.

Ich habe es nun unternommen, das Serumverfahren, welches nach Lage der Dinge die meiste Aussicht auf Erfolg bietet, auf Grund der neuesten Erfahrungen zu verbessern.

Zu diesem Zwecke wurden einige Pferde, von welchen man annehmen konnte, daß sie gesalzen waren, höher immunisiert. Für das Ausgangsmaterial zu diesen Versuchen habe ich Herrn Colonel B o d l e meinen Dank abzustatten, welcher mir ein an Horse-sickness erkranktes Pferd nach Hillside Camp schickte. Von diesem Pferde, welches schon auf dem Wege starb und bei der Obduktion alle charakteristischen Merkmale der Horse-sickness zeigte, wurde Blut entnommen und auf einige Pferde verimpft, nämlich auf mehrere gesalzene und auf ein ungesalzenes.

<sup>1)</sup> Aus dem „Deutschen Kolonialblatt“ Nr. 14 und 15. 1904.

Das letztere bekam die Krankheit und starb, die gesalzenen Pferde blieben dagegen vollkommen gesund. Sie erhielten nun, nachdem durch die erfolglose Impfung bewiesen war, daß sie in Wirklichkeit gesalzen waren, große Dosen von virulentem Blut teils subkutan, teils intravenös in Intervallen von 3—4 Wochen eingespritzt. Die Dosen betragen in der Regel 2 Liter. Diese außerordentlich großen Mengen von virulentem Blut wurden von den gesalzenen Pferden ohne jede auffallende Störung gut ertragen. Nach einigen Einspritzungen wurde dann Serum von einem der so behandelten Pferde genommen und daraufhin geprüft, ob bereits Schutzstoffe darin enthalten waren. Es zeigte sich aber nur, daß durch dasselbe die Inkubationszeit und auch der Krankheitsverlauf etwas verlängert wurden. Es waren also höchstens Andeutungen dafür vorhanden, daß Schutzstoffe in der Bildung begriffen waren. Die Pferde wurden dann weiter mit großen Dosen von virulentem Blut behandelt und ihr Serum einige Monate später wieder geprüft. Diesmal fanden wir, daß das Serum schon recht starke Schutzwirkung besaß. Um dies festzustellen, wurde in folgender Weise verfahren: Es wurden mehreren Pferden abgestufte Mengen von Serum subkutan injiziert und am folgenden Tage ebenfalls subkutan eine Dosis von virulentem Blut gegeben, von welcher wir wußten, daß sie absolut tödlich wirken mußte, da wir dieselbe Dosis mehrfach angewandt und damit ausnahmslos einen tödlich verlaufenden Anfall von Horse-sickness erzielt hatten.

Zu diesem Versuche waren fünf Pferde verwendet. Davon erkrankte eins, ein junges Tier (5 Jahre alt), überstand aber die Krankheit und war danach, wie wiederholte erfolglose Injektionen von virulentem Blut bewiesen, vollkommen immun, d. h. gesalzen. Die übrigen vier Pferde, zwei alte und zwei junge, wurden überhaupt nicht krank.

Es entstand nun aber die Frage, ob nicht etwa diese Tiere, entgegen unserer Annahme, schon vorher gesalzen waren. Um dies zu erfahren, wurde 15 Tage nach Injektion des Serums den beiden alten Tieren und einem der beiden jungen dieselbe Dosis von virulentem Blut gegeben wie das erste Mal. Alle drei Pferde erkrankten diesmal und starben an Horse-sickness.

Damit war bewiesen: erstens, daß die Pferde, welche zu unserem Versuche benutzt wurden, empfänglich waren für Horse-sickness; zweitens, daß sie durch das Serum gegen eine absolut tödliche Dosis von virulentem Blute geschützt wurden; drittens, daß dieser Schutz höchstens 15 Tage vorgehalten hatte.

Es wurde nun weiter untersucht, ob das Serum imstande sei, auch nach Ausbruch der Krankheit einen heilenden Einfluß auszuüben. Dies ist leider nicht der Fall. In mehreren Fällen erhielten Pferde, bei denen das erste Symptom der beginnenden Krankheit, nämlich der Anstieg der Körpertemperatur, sich zeigte, sofort große Dosen von Serum, subkutan oder intravenös injiziert, die Injektionen wurden auch wiederholt und bei einzelnen Tieren bis über 1 Liter gegeben, ohne daß der tödliche Ausgang der Krankheit abgewendet werden konnte. Nur an dem vorübergehenden Abfall der Temperatur und an der verlängerten Dauer der Krankheit ließ sich auch hier ein gewisser Einfluß des Serums erkennen. In dieser Beziehung verhält sich unser Serum ähnlich wie das Tetanus- und das Pestserum, welche beide auch eine bedeutende präventive, aber keine oder nur sehr geringe kurative Wirkung besitzen.

Bei diesen Versuchen stellte sich nun aber die außerordentlich wichtige Tatsache heraus, daß unser Serum vollkommen frei war von der höchst unangenehmen Eigenschaft, daß es hämolytisch wirkt und infolgedessen Hämoglobinurie erzeugt, eine Eigenschaft, welche, wie bereits erwähnt wurde, anderen Experimentatoren die größten Hindernisse bereitet hatte. Wir konnten das Serum gesunden und kranken Tieren in den größten Dosen sowohl subkutan als auch intravenös injizieren, ohne daß jemals auch nur eine

Spur von Hämoglobinurie eintrat. Diese Eigenschaft wurde übrigens nicht etwa nur am Serum eines einzigen Tieres konstatiert, welches vielleicht zufällig nicht hämolytisch wirkte, sondern am Serum von allen drei Pferden, welche von uns bis jetzt zur Serumgewinnung präpariert waren.

Wir waren also im Besitze eines Serums, welches kräftige präventive und keine hämolytische Eigenschaft hatte, und wir konnten nun daran denken, dasselbe für eine Schutzimpfung, ähnlich wie bei der Rinderpest, zu verwenden. Es kam nur darauf an, eine solche Kombination von Serum und Virus zu finden, welche einen milden Anfall der Horse-sickness entstehen läßt, stark genug, um Immunität zu erzeugen, und nicht so stark, als daß er gefährlich werden könnte. Es mußte also ermittelt werden, welche Dosis des Virus die zweckmäßigste ist, ob es vorteilhaft ist, eine sehr starke Dosis anzuwenden oder nur eine solche, welche eben ausreicht, um tödlich zu wirken. Ferner muß für die als zweckmäßig gefundene Virusdosis die passende Dosis von Serum bestimmt werden. Dann ist weiter zu ermitteln, ob es besser ist, Virus und Serum zu gleicher Zeit oder mit einem Zwischenraum von einem oder mehreren Tagen, ob das Virus vor dem Serum oder umgekehrt zu geben ist. Auch der Ort, wo die Injektionen zu machen sind, und die Art und Weise, ob subkutan oder intravenös, muß gefunden werden. Es gibt also eine Menge Fragen, welche der Antwort harren, und die Lösung derselben kann nur auf experimentellem Wege geschehen. Hätte man genügend zahlreiche Versuchstiere zur Verfügung und könnte größere Versuchsreihen machen, dann ließen sich die angegebenen Aufgaben in verhältnismäßig kurzer Zeit lösen. Ich konnte aber nur an wenigen Tieren experimentieren, und so blieb mir nichts anderes übrig, als einzelne Versuche herauszugreifen, welche, wie mir schien, am schnellsten zum Ziele führen würden. Außerdem kam es mehrfach vor, daß die Experimente wiederholt werden mußten, weil im Laufe des Versuchs, da wir vorwiegend alte, billige Pferde benutzten, es zweifelhaft wurde, ob sie nicht schon vorher gesalzen waren. Infolgedessen sind wir nur langsam vorwärts gekommen. Aber wir haben doch bis jetzt einige recht interessante und auch praktisch wichtige Resultate erhalten.

Zunächst konnten wir feststellen, daß es möglich ist, bei Pferden durch Kombination von Virus und Serum einen abgeschwächten Anfall von Horse-sickness zu erzeugen, welchen sie gut überstehen und infolgedessen gesalzen sind. Auch ein sehr leichter Anfall, welcher sich nur durch mehrtägige Temperatursteigerung ohne anderweitige sichtbare Symptome zu erkennen gibt, scheint schon eine ausreichende Immunität zu verleihen. Wir haben zurzeit drei Pferde und zwei Maultiere, welche auf diese Weise künstlich gesalzen sind und nach überstandenen Anfall die Injektion von absolut tödlichen Dosen von virulentem Blut ohne Schaden vertragen haben. Selbstverständlich müssen diese Tiere später noch der natürlichen Infektion ausgesetzt werden. Aber nach allen bisherigen Erfahrungen ist nicht zu bezweifeln, daß derartig immunisierte Tiere auch der natürlichen Infektion widerstehen werden.

Ferner konnten wir feststellen, daß das Serum, selbst wenn es am 4. Tage nach der Injektion des Virus gegeben wird, noch imstande ist, den Ausbruch der Krankheit zu unterdrücken. Ich verspreche mir gerade von dieser Kombination gute Erfolge, weil bei dieser Anordnung dem Virus genügend Zeit gelassen wird, um sich zu entwickeln und aktiv immunisierend zu wirken. Es sind bis jetzt drei Tiere nach dieser Methode immunisiert, und zehn Pferde und ein Maultier sind augenblicklich in Behandlung. Um ganz sicher zu gehen und keine unnötigen Verluste dabei zu haben, fing ich mit verhältnismäßig großen Dosen von Serum an und gehe allmählich mit der Serumdosis herunter. Aber gerade diese Experimente erfordern viel Zeit, weil bei jedem Versuch 14 Tage nach der Seruminjektion gewartet werden muß, ehe das Tier von neuem in-

jiziert werden kann; denn es muß erst die Wirkung des vorher injizierten Serums, welche, wie früher erwähnt wurde, etwa 2 Wochen andauert, verschwunden sein.

Daneben sind aber auch Versuche im Gange, um zu sehen, ob durch gleichzeitige Injektion von Virus und Serum, wie es in der sogenannten simultaneous Method bei Rinderpest geschieht, gute Resultate zu erzielen sind.

Nach dem, was bis jetzt schon erreicht ist, bin ich fest davon überzeugt, daß auf dem einen oder dem anderen der bezeichneten Wege eine brauchbare Schutzimpfung gefunden werden muß, und ich beabsichtige, sobald ich durch die im Gange befindlichen Experimente noch mehr orientiert bin, eine größere Zahl der am 3. Februar hier angelangten jungen argentinischen Pferde künstlich zu immunisieren.

Ich glaube, daß ich bis Ende März imstande sein werde, diese Untersuchungen über Horse-sickness zum Abschluß bringen zu können.

\*                      \*                      \*

B u l u w a y o, den 28. März 1904.

Bei den Untersuchungen über künstliche Immunisierung gegen Horse-sickness hat sich gezeigt, daß eine genaue Befolgung ganz bestimmter Vorschriften notwendig ist, wenn übereinstimmende Resultate erzielt werden sollen. Ganz besonders gilt dies für die Herstellung der beiden Substanzen, welche die Grundlage des Immunisierungsverfahrens bilden, des Virus und des Serums. Ich habe es deswegen für zweckmäßig erachtet, eine eingehende Beschreibung von der Herstellung des Virus und des Serums zu geben und dieselbe diesem Berichte als Anhang beizufügen.

Da sowohl das Virus als das Serum, nachdem ihnen konservierende Stoffe zugesetzt sind, sich sehr lange Zeit wirksam erhalten, so ist es zweckmäßig, sich von beiden Substanzen einen hinreichenden Vorrat zu beschaffen, um stets unter gleichen Bedingungen arbeiten zu können. Ist genügend Virus und Serum beschafft, dann ist die nächste Aufgabe, dasjenige Verhältnis zwischen beiden Substanzen zu finden, bei welchem sie sich entweder gerade oder doch nahezu aufheben; außerdem wird man aus ökonomischen Gründen dieses Verhältnis so wählen, daß der Verbrauch von Serum ein möglichst geringer ist. Letzteres wird aber dann der Fall sein, wenn die Dosis des Virus so bemessen wird, daß sie ohne Serum gerade noch ausreichend ist, um einen unzweifelhaften Anfall von Horse-sickness hervorzurufen.

Um diese Dosis zu finden, habe ich damit begonnen, einigen Pferden, welche an Horse-sickness leiden sollten, um das Blut zum Fortifizieren von gesalzenen Tieren zu liefern, verschiedene Dosen von unkonserviertem und von konserviertem virulenten Blut zu injizieren.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse dieser Versuche:

A. unkonserviertes Blut:			B. konserviertes Blut:		
Nr.	Dosis	Inkub.-Stad.	Nr.	Dosis	Inkub.-Stad.
1	20 ccm	3 Tage	5	10 ccm	5 Tage
2	15 „	5 „	6	5 „	6 „
3	5 „	6 „	7	5 „	7 „
4	1 „	10 „	8	5 „	6 „

Sämtliche Tiere erkrankten an typischer Horse-sickness, starben und zeigten bei der Obduktion die für die Horse-sickness charakteristischen Symptome.

Bemerkenswert ist noch, daß das Inkubationsstadium bis zu einem gewissen Grade von der Virusdosis abhängig ist. Am kürzesten, nur 3 Tage, betrug es nach der größten Dosis, am längsten nach der geringsten Dosis, 1 ccm unkonserviertes Blut. Letzteres

war außerdem faulig, da es ohne konservierenden Zusatz und ungenügend verschlossen seit 39 Tagen im Bisschrank gestanden hatte. Es ist sehr wahrscheinlich, daß in diesem Blute die Parasiten der Horse-sickness zum größten Teil abgestorben waren und nur noch sehr wenige zur Wirkung gekommen sind. Das in diesem Falle beobachtete Inkubationsstadium von 10 Tagen wird daher wohl zu den längsten gehören, welche nach Virusinjektion vorkommen. Wir haben denn auch unter 28 Fällen von künstlicher Infektion nur in einem Falle, der wegen Komplikation mit Abszeß und Tsetseerkrankung nicht rein ist, eine längere Inkubation von 11 Tagen beobachtet. In der Regel bleibt das Inkubationsstadium zwischen 6 und 9 Tagen.

Da die Dosis von 5 ccm konserviertem Virus regelmäßig getötet hatte und auch von anderen Experimentatoren als sicher tödliche Dosis angesehen wird, so habe ich die ersten Kombinationsversuche von Serum und Virus mit dieser Dosis angestellt, und zwar wurden in verschiedenen Versuchsreihen das eine Mal zuerst Serum und hinterher Virus, das andere Mal das Virus zuerst gegeben. Das Resultat der ersteren Reihe habe ich bereits in meinem Bericht vom 7. Februar mitgeteilt. Über die zweite Reihe gibt die nachstehende Tabelle Auskunft:

	Virus	Zwischenzeit	Serum	Resultat
1.	5 ccm	1 Tag	120	gestorben
2.	5 „	2 Tage	300	„
3.	5 „	3 „	300	schwerer Anfall
4. (Maultier)	5 „	3 „	200	leichter Anfall
5. „	5 „	3 „	300	„ „

Sämtliche Tiere dieser Versuchsreihe erkrankten an Horse-sickness, die mit ein und 2 Tagen Intervall so schwer, daß sie starben; die drei übrigen überstanden den Anfall und waren danach so hoch immun, daß sie große Dosen von Virus vertrugen, ohne nochmals zu erkranken.

Hiernach mußte man annehmen, daß es vorteilhafter ist, das Serum nicht früher als am 4. Tage nach dem Virus zu geben. Ferner mußte versucht werden, ob nicht mit erheblich kleineren Dosen von Virus operiert werden kann, um dementsprechend auch mit einem geringeren Quantum Serum auszukommen.

Zu diesem Zwecke wurde folgende Versuchsreihe angestellt:

	Virus	Zwischenzeit	Serum	Resultat
1.	0,25	3 Tage	400	kein Anfall
2.	0,25	3 „	400	„ „
3.	0,2	3 „	200	„ „
4.	0,2	3 „	200	sehr leichter Anfall
5.	0,2	3 „	200	tödlicher Anfall
6.	0,2	2 „	100	kein Anfall
7.	0,2	1 „	100	„ „
8.	0,1	3 „	400	„ „
9. (Maultier)	0,1	3 „	300	„ „

In dieser Versuchsreihe waren die Resultate schon erheblich besser. Nur zwei Tiere erkrankten, das eine leicht, das andere mit einem tödlichen Anfall, alle übrigen blieben ohne irgendwelche sichtlichen Erkrankungserscheinungen und wurden später weiterbehandelt. Die beiden erkrankten Pferde waren junge, frisch importierte Argentinier, während die übrigen ältere Tiere waren, die sich schon längere Zeit in Südafrika befanden. Da sich hiermit herausstellte, daß die Empfänglichkeit der Pferde gegen Horse-sickness eine sehr verschiedene ist und das Immunisierungsverfahren natürlich für die

am meisten empfindlichen Tiere berechnet werden muß, so ging ich mit der Virusdosis noch erheblich weiter herunter und benutzte für die nächste Reihe nur noch die hochempfindlichen jungen Argentinier. Um aber dem Virus mehr Gelegenheit zu geben, auf den Organismus immunisierend zu wirken, dehnte ich die Zwischenzeit zwischen Virus und Serum um einen Tag weiter aus, da ich von der Annahme ausging, daß, wenn eine geringere Virusdosis angewendet wird, eine um so längere Inkubationszeit zu erwarten ist und das Risiko der späteren Anwendung des Serums deswegen nicht wesentlich größer wird.

Diese Versuchsreihe, bei welcher ich auf 0,01 cem Virus herabging, gestaltete sich folgendermaßen:

	Virus	Zwischenzeit	Serum	Resultat
1.	0,01	4 Tage	200	sehr leichter Anfall
2.	0,01	4 „	200	„ „ „
3.	0,01	4 „	200	„ „ „
4.	0,01	4 „	100	kein Anfall
5.	0,01	4 „	100	„ „
6.	0,01	4 „	100	„ „
7.	0,01	4 „	100	„ „
8.	0,01	4 „	50	„ „
9.	0,01	4 „	50	mittelschwerer Anfall

Zu dieser Reihe gehören dann noch die folgenden beiden Tiere mit tödlichem Anfall.

	Virus	Zwischenzeit	Serum	Resultat
10.	0,01	4 Tage	200	tödlicher Anfall
11.	0,01	4 „	100	„ „

Um zunächst über diese beiden letzten Fälle Aufklärung zu geben, sei bemerkt, daß Nr. 10 nicht das gleiche Virus erhalten hat wie alle übrigen Tiere, sondern ein anderes, hergestellt aus dem Blute eines Pferdes, welches durch sogenanntes Passagevirus infiziert wurde, d. h. durch ein Virus, das sukzessive mehrmals auf Pferde verimpft und dadurch wahrscheinlich zu einer größeren Virulenz herangezüchtet war. Ob diese Erklärung richtig ist, müßte durch weitere Versuche mit Passagevirus geprüft werden. Ich konnte für diesen Zweck keine Tiere opfern und habe es deshalb vorgezogen, dieses Virus nicht ferner zu gebrauchen. Auf jeden Fall lehrt dieser Versuch, daß das Horse-sickness-Blut verschiedene Grade von Virulenz haben kann, und daß man deswegen, wie bereits früher angeraten ist, sich einen großen Vorrat von einem bestimmten Virus halten soll, dessen Eigenschaft man genau prüfen muß, bevor man es in der Praxis verwendet.

Bei dem Pferd Nr. 11 ist insofern von dem sonst üblichen Verfahren abgewichen, als das Virus und das Serum auf verschiedenen Seiten des Halses injiziert wurden, während die übrigen Tiere beide Injektionen stets an derselben Halsseite erhielten. Nur diesem Umstande möchte ich es zuschreiben, daß das Serum nicht zur vollen Wirkung kam. Daß es nicht ganz wirkungslos geblieben war, ließ sich daran erkennen, daß der Krankheitsverlauf ein sehr protrahierter war und ganz den Anschein erweckte, als ob das Pferd die Krankheit überstehen würde.

Daraus, daß Nr. 11 trotz Serumwirkung einen tödlichen Anfall, Nr. 9 einen mittelschweren und Nr. 1, 2, 3 leichte Anfälle hatten, geht zur Genüge hervor, daß die Dosis von 0,01 cem des von uns benutzten Virus für hochempfindliche Pferde ausreichend ist, um eine tödliche Infektion zu bewirken. Höchstwahrscheinlich liegt die einfach tödliche Dosis noch erheblich tiefer, und man würde bei sehr empfindlichen oder sehr

wertvollen Tieren als Anfangsdosis für die Immunisierung eine geringere, vielleicht 0,005 ccm oder 0,002 ccm zu nehmen haben. Auch durch Verkürzung des Intervalls von 4 Tagen auf 3 Tage kann die Gefahr verringert werden. Aber vorläufig scheint mir die in der letzten Versuchsreihe benutzte Kombination von 0,01 ccm Virus und 100 ccm Serum mit 4 Tagen Zwischenraum eine sehr zweckmäßige zu sein, da sämtliche Pferde, und zwar hochempfindliche Tiere, dieselbe gut vertragen haben, wenn die dabei zu befolgenden Regeln genau eingehalten wurden.

Auch die Serumdosis von 100 ccm scheint die gerade richtige zu sein, wie daraus hervorgeht, daß von den beiden Tieren 8 und 9, welche nur 50 ccm erhielten, eins erkrankte, aber glücklicherweise am Leben blieb. Vielleicht könnte man in Zukunft mit Rücksicht auf Serumersparnis versuchen, ob nicht 75 ccm ausreichend sind.

Es kam nun weiter darauf an, zu ermitteln, ob die so behandelten Tiere auch einen gewissen Grad von aktiver Immunität erlangt hatten, auf welchem man weiter bauen konnte.

Ich ließ deswegen allen Tieren, welche 0,01 ccm Virus überstanden hatten, die fünffache Dosis Virus, also 0,05 ccm, und nach einer Pause von 4 Tagen nur die Hälfte Serum, nämlich 50 ccm, injizieren. Um eine Kontrolle zu haben, erhielt ein junges argentinisches Pferd, welches bis dahin noch nicht behandelt war, dieselben Dosen von Virus und Serum. Das Resultat dieses Versuches war, daß von den vorbehandelten Tieren kein einziges irgendeine Krankheitserscheinungen, nicht einmal vorübergehende Temperatursteigerungen zeigte, während das Kontrolltier innerhalb der gewöhnlichen Inkubationszeit schwer an Horse-sickness erkrankte und starb.

Damit war bewiesen, daß die erste Virus-Serumkombination den Tieren einen erheblichen Grad von aktiver Immunität verliehen hatte. Ein Rest von passiver Immunität konnte es aus dem Grunde nicht sein, weil die zweite Injektion von Virus 12 Tage nach der Seruminjektion gegeben wurde; also zu einer Zeit, wo die Wirkung des Serums vorübergegangen war.

Nach diesem ersten Schritt in der Steigerung der Virusdosis wurde dann ein weiterer Schritt getan und den Tieren 0,2 ccm Virus, d. h. das Vierfache der letzten Dosis, in Kombination mit 50 ccm Serum und 4 Tagen Zwischenraum injiziert, selbstverständlich nicht vor Ablauf von 12 Tagen nach der letzten Seruminjektion. Nachdem auch diese Dosis ohne jede Reaktion ertragen war, bin ich zu Injektionen von Virus ohne Serum übergegangen, und zwar zunächst auf 0,2 ccm, bei einigen Tieren auch sofort auf 0,5 ccm.

Da auch diese Injektionen gut vertragen wurden, so hatten die Pferde, welche in der geschilderten Weise behandelt waren, nunmehr schon einen solchen Grad von Immunität erreicht, daß sie Virusdosen vertrugen, welche 20- bis 30mal höher sind als 0,01, d. h. die einfach tödliche Dosis. Bis jetzt sind 14 Pferde so weit gebracht, daß sie 0,2 bzw. 0,5 Virus (allein) ohne Reaktion vertragen, und in wenigen Tagen werden die übrigen diese Stufe erreicht haben.

Ob dieser Grad von Immunität ausreichend ist, um gegen die natürliche Infektion zu schützen, kann nur durch das Experiment entschieden werden, und es müssen zu diesem Zweck derartige Tiere längere Zeit der natürlichen Infektion ausgesetzt werden. Sollte sich dabei herausstellen, daß sie noch nicht genügend immunisiert sind, dann sind sie in der angegebenen Weise sehr leicht auf beliebig höhere Stufen der Immunität zu bringen, bis man zu einer solchen gelangt, welche auch gegen die natürliche Infektion absoluten Schutz gewährt. Dasselbe gilt von der Dauer dieser künstlichen Immunität. Wenn dieselbe sich bei der Prüfung in der Praxis als zu kurz ergeben sollte, dann kann sie durch gelegentliche Injektionen von Virus immer wieder aufgefrischt werden.

Bei dem Arbeiten mit Virus ohne Serum ist nur zu berücksichtigen, daß man,

soweit meine bisherigen Erfahrungen reichen, die Dosen nicht so schnell steigern kann wie bei der Kombination von Virus mit Serum. Bei letzterer kann man unbedenklich zu fünf- bis zehnfach höheren Dosen übergehen. Bei Anwendung von Virus allein bin ich in der Regel nur um das Doppelte gestiegen. Vielleicht bin ich hierbei aber auch in der Vorsicht zu weit gegangen, weil ich bei der geringen Zahl meiner Versuchstiere so wenig als möglich verlieren wollte. Es würde Sache späterer Versuche sein, zu prüfen, ob man nicht auch mit dem Virus allein erheblich schneller steigen kann.

Sollte es etwa notwendig werden, über 10 ccm Virus hinauszugehen, dann würde es nicht mehr angängig sein, das konservierte Virus zu benutzen, weil dasselbe zuviel Glycerin enthält; man müßte in diesem Falle frisches Blut oder solches verwenden, welches aseptisch unter Zusatz von Kaliumzitrat zur Verhütung der Gerinnung in Gläsern aufgefangen ist und sich unter Paraffinverschluß monatelang in flüssigem Zustande und vollkommen wirksam aufbewahren läßt.

Das Schema zum künstlichen Immunisieren gegen Horse-sickness gestaltet sich nach den bisherigen Erfahrungen also folgendermaßen:

- I. Stufe 0,01 ccm Virus subkutan am Halse,  
vier Tage Intervall.  
100 ccm Serum (auf derselben Seite subkutan eine Handbreit tiefer injiziert als das Virus),  
zwölf Tage Pause.
- II. „ 0,05 ccm Virus,  
vier Tage Intervall.  
50 ccm Serum,  
zwölf Tage Pause.
- III. „ 0,2 ccm Virus,  
vier Tage Intervall.  
50 ccm Serum,  
zwölf Tage Pause.
- IV. „ 0,5 ccm Virus,  
zwölf Tage Pause.
- V. „ 1,0 ccm Virus,  
zwölf Tage Pause.
- VI. „ 2 ccm Virus,  
zwölf Tage Pause.
- VII. „ 5 ccm Virus usw.

Die in diesem Schema angegebenen Dosen gelten natürlich nur für das von uns gebrauchte Virus und Serum. Aber mit wenigen Versuchen kann für jedes andere Virus und Serum diejenige Dosis ermittelt werden, welche für die erste Stufe die geeignetste ist. Gerade auf diese kommt es offenbar am meisten an, weil durch dieselbe die wichtige Grundimmunität geschaffen wird. Unsere Tiere reagierten, wenn sie es überhaupt taten, nur auf dieser Stufe; bei den späteren haben wir niemals mehr eine Reaktion beobachtet.

Hält man sich dann ganz genau an das Schema, unter Berücksichtigung der etwa erforderlichen Modifikation der Dosen, dann wird voraussichtlich die Immunisierung mit gar keinem Verluste an Pferden verbunden sein. Man kann aber, wenn man die Vorsicht noch weiter treiben will, als ich es getan habe, der Stufe I noch eine Stufe Ia mit 0,005 ccm Virus und 100 ccm Serum oder mit 0,002 ccm Virus und 50 ccm Serum vorausschicken, wie bereits früher erwähnt wurde.



Um ein Tier bis zur Widerstandsfähigkeit gegen 0,5 ccm Virus zu bringen, würden nach dem Schema 48 Tage erforderlich sein; bis zu 5 ccm Virus braucht man 36 Tage mehr, im ganzen also etwa 3 Monate. Ein so langer Zeitraum ist aber nur dann erforderlich, wenn man ganz sicher gehen will. Kommt es darauf an, schneller zu immunisieren, dann muß man einzelne Stufen auslassen, womit natürlich immer eine gewisses Risiko verbunden ist. In mehreren Fällen, namentlich wenn schon auf der ersten Stufe eine geringe Temperatursteigerung von mehrtägiger Dauer sich bemerkbar gemacht hatte, welche als der Ausdruck einer sehr leichten Reaktion aufzufassen war, habe ich es riskiert, das Schema abzukürzen, indem ich die dritte Stufe ausließ und sofort zum Virus allein übergieng. Bisher habe ich damit jedesmal Erfolg gehabt und damit die Dauer der Immunisierung auf einen Monat abgekürzt. Es würde später zu versuchen sein, ob diese Abkürzung nicht regelmäßig anwendbar ist. Vielleicht wird sich bei weiteren Erfahrungen in der Praxis überhaupt herausstellen, daß die Immunisierung erheblich kürzer zu bewerkstelligen ist, als ich es getan habe. Aber es kam mir vor allen Dingen darauf an, die Grundlage für ein Immunisierungsverfahren zu finden, und zwar für ein solches, bei welchem Verluste ganz sicher ausgeschlossen sind.

In dieser Beziehung möchte ich noch bemerken, daß alle Tiere, welche eine starke Reaktion, d. h. einen regelrechten Anfall von Horse-sickness hatten, sofort eine vollständige und sehr hohe Immunität besaßen, so daß wir bald nach dem Anfall 5 ccm Virus geben konnten. Diese Tiere, sechs an der Zahl, hatten ihre Immunität schon nach 15 bis 20 Tagen, je nach der Dauer des Anfalles, erworben. Hiermit ist aber immer eine erhebliche Gefahr für die Tiere verbunden, und es erscheint mir deswegen ratsamer, wenn es auf schnelle Immunisierung ankommt, dahin zu streben, daß die Tiere auf der ersten Stufe eine sehr milde, nur an der Temperaturkurve merkbare Reaktion durchmachen, was sich bei einiger Übung durch Modifikationen der Virus- und Serumdosen sicher erreichen lassen wird. In diesem Falle würde die Immunisierung etwa 1 bis 1½ Monate in Anspruch nehmen.

Unter gewöhnlichen Verhältnissen wird es sich aber so einrichten lassen, daß die Neuanschaffung von Pferden in der Zeit geschieht, in welcher die Horse-sickness ruht, und dann ist eine langsame, ganz ungefährliche und möglichst hoch getriebene Immunisierung entschieden vorzuziehen.

In meinem ersten Bericht über Horse-sickness hatte ich Versuche mit simultaner Anwendung von Virus und Serum, nach Analogie der Schutzimpfung gegen Rinderpest, in Aussicht gestellt. Leider konnte ich hierfür nur vier Pferde verwenden, und ich bin deswegen noch nicht zu abschließenden Resultaten gekommen. Die Versuchsanordnung schloß sich in bezug auf die Dosierung von Virus und Serum ganz an das andere, hauptsächlich studierte Verfahren an. Die Injektionen wurden aus theoretischen Gründen, deren Darlegung hier zu weit führen würde, nicht wie bei der Rinderpest auf verschiedenen Seiten, sondern auf derselben Seite gemacht, und zwar die Virusinjektion oben und die Seruminjektion fünf Finger breit darunter. Ein etwas älteres Tier erhielt mit 12tägigen Zwischenräumen:

I. Stufe	0,2 ccm	Virus	und	100 ccm	Serum,
II. „	0,2	„	„	50	„ „
III. „	0,5	„	„	50	„ „
IV. „	0,5	„	„	allein,	
V. „	1,0	„	„	„	

Es trat niemals die geringste Reaktion ein.

Drei junge argentinische Pferde erhielten ebenfalls mit 12tägigen Zwischenräumen:

I. Stufe:	Nr. 1	0,01	ccm Virus und	100 ccm Serum
	„ 2	0,01	„ „ „	75 „ „
	„ 3	0,01	„ „ „	50 „ „
II. „	„ 1	0,1	„ „ „	100 „ „
	„ 2	0,075	„ „ „	75 „ „
	„ 3	0,05	„ „ „	50 „ „
III. „	„ 1 bis 3	gleichmäßig	0,2 ccm Virus und	50 ccm Serum.
IV. „	„ 1	0,5	ccm Virus,	
	„ 2	0,2	„ „	
	„ 3	0,1	„ „	

Die weitere Behandlung geschieht ebenso wie bei dem ersten Verfahren, also 1,0, 2,0, 5,0 ccm Virus.

Die Zeit nach den letzten Injektionen ist noch zu kurz, um das Resultat erkennen zu lassen. Da bei allen vorhergehenden Injektionen niemals eine Spur von Reaktion zu bemerken war, so ist es mir fraglich, ob die Tiere gegen die letzten Virusdosen sich hinreichend geschützt zeigen werden. Sollte dies der Fall sein, dann müßten die Versuche in dieser Richtung fortgesetzt und insbesondere angestrebt werden, auch bei der simultanen Applikation von Virus und Serum durch Herabsetzung der Serum- oder Steigerung der Virusdosis auf der ersten Stufe eine deutliche Reaktion zu erzwingen. Wenn das gelingt, würde dies Verfahren den Vorzug der Einfachheit und kürzeren Dauer haben. Sollte es aber nicht gelingen, dann verspricht das erstbeschriebene Verfahren mit getrennter Injektion von Virus und Serum eine kräftigere und dauerhaftere Immunität, weil bei demselben dem Virus eine gewisse Zeit gelassen wird, um auf den Organismus seine immunisierende Kraft ausüben zu können. Bei der vergleichenden Prüfung der nach den beiden verschiedenen Verfahren immunisierten Pferde gegenüber der natürlichen Infektion wird es sich sehr bald herausstellen, welches von beiden Verfahren das für praktische Zwecke vorteilhaftere ist.

Nachdem sich die Tatsache ergeben hatte, daß durch stufenweise Steigerung der mit Serum kombinierten Virusdosis eine Widerstandsfähigkeit gegen sehr hohe isolierte Virusdosen zu erreichen ist, lag die Frage nahe, ob es nicht möglich sei, auch ohne Serum, allein mit steigenden Virusdosen, denselben Grad von Widerstandsfähigkeit, d. h. Immunität, zu erzielen.

Zu Beantwortung dieser Frage konnte ich auch aus Mangel an Versuchstieren nur wenige Experimente anstellen, welche aber doch erkennen ließen, daß es in der Tat möglich ist, auch auf diesem Wege gegen Horse-sickness zu immunisieren. Ein Pferd haben wir so weit gebracht, daß es 0,1 ccm Virus ohne Reaktion ertrug, zwei andere bis 0,2 ccm Virus. Aber es scheint so, als ob man nur sehr langsam und in größeren Zeitabständen die Virusdosen erhöhen darf als bei den kombinierten Methoden. Dieses Verfahren mit Virus ohne Serum würde also für praktische Zwecke wohl kaum in Betracht kommen, so interessant dasselbe auch in theoretischer Beziehung ist.

#### Schl u ß f o l g e r u n g e n.

1. Durch kombinierte Injektionen von Virus und Serum können Pferde auf eine ganz ungefährliche Weise gegen Horse-sickness immunisiert werden.

2. Das von mir gefundene Verfahren wird sich voraussichtlich so weit vereinfachen lassen, daß ein Pferd in 1 bis 1½ Monaten hinreichend gesalzen ist.

3. Die Injektionen werden zwei- bis dreimal mit steigenden Dosen von Virus wiederholt.

4. Darauf kann man zu Injektionen von Virus ohne Serum übergehen.

5. In 1½ Monaten kann ein Pferd so weit gebracht werden, daß es 0,5 ccm Virus ohne Reaktion erträgt.

6. Sollte ein höherer Grad von Immunität erforderlich sein, damit das Pferd absolut gegen die natürliche Infektion geschützt ist, dann ist dies in verhältnismäßig kurzer Zeit durch Fortsetzung des Verfahrens zu erreichen.

7. Es ist wahrscheinlich, daß auch durch simultane Injektionen von Virus und Serum Pferde so weit immunisiert werden können, daß sie das Virus allein vertragen.

\* \* \*

### Herstellung des Virus.

Das erforderliche Blut wird dem Tiere kurze Zeit vor dem Tode entnommen, wenn die Symptome der Horse-sickness, nämlich Schwellung über den Augen, beschleunigte und mühsame Respiration, einen hohen Grad erreicht haben. Man nimmt mit Hilfe eines Troikarts etwa 1½ bis 2 Liter aus der Vena jugularis und defibriert es durch Schlagen mit einem Drahtbündel oder einem anderen geeigneten Gegenstand. Das gut defibrierte Blut wird durch angefeuchtete Gaze filtriert. Um dasselbe zu konservieren, wird unter Benutzung einer von Edington angegebenen Formel folgende Mischung hergestellt:

Ein Teil Phenol wird in 1000 Teilen Wasser gelöst, hierzu zunächst 1000 Teile Glycerin und dann unter beständigem Umschütteln 1000 Teile defibriertes Blut gemischt.

Es ist selbstverständlich, daß alles, was mit dem Blut in Berührung kommt, Instrumente, feuchte Gaze, Gefäße, vorher gut desinfiziert sein muß. Auch das zur Mischung verwendete Wasser, am besten Regenwasser, muß sterilisiert sein.

Die so hergestellte Blutmischung bleibt in einer großen Flasche 2 bis 3 Wochen an einem kühlen, dunklen Orte (womöglich Eisschrank) stehen. Während dieser Zeit lösen sich die roten Blutkörperchen, aber ihre Hüllen und die übrigen geformten Bestandteile des Blutes senken sich zu Boden oder bleiben in Form von feinen Flocken in der Flüssigkeit schweben. Nach allem, was wir über das Virus der Horse-sickness wissen, ist es wahrscheinlich, daß dasselbe an den roten Blutkörperchen haftet, und daß somit ein mehr oder weniger großer Teil desselben an den Hüllen der Blutkörperchen sitzen bleibt und mit diesen in die Flocken übergeht, welche in der Flüssigkeit suspendiert sind. Wenn diese Flocken, welche sich niemals ganz gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilen, nicht entfernt werden, dann ist es unmöglich, das Virus genau zu dosieren, und ich glaube, daß einige Unregelmäßigkeiten, welche bei unseren anfänglichen Versuchen beobachtet wurden, darauf zurückzuführen sind, daß dieser Umstand nicht berücksichtigt war.

Die Flüssigkeit muß deswegen, nachdem den geformten Blutbestandteilen hinreichend Zeit gelassen wurde, sich zusammenzuballen und die erwähnten Flocken zu bilden, also nach 2 bis 3 Wochen, durch angefeuchtete, sterilisierte Gaze filtriert werden. Dieses Filtrat ist eine dunkelrotbraune Flüssigkeit, welche in dünnen Schichten und namentlich in ihren Verdünnungen vollkommen klar sein muß. Sollte die Viruslösung irgendwelche Trübung oder Flockenbildung zeigen, dann ist sie nicht geeignet zum Gebrauch.

Nach dem Filtrieren füllt man die Flüssigkeit in Gläser von 50 bis 100 ccm Inhalt so weit, daß ein möglichst geringer Luftraum bleibt, schließt sie mit Glasstöpsel und bewahrt sie wieder im Eisschrank auf.

Zur Bereitung der Verdünnungen, welche jedesmal frisch hergestellt werden, dient physiologische NaCl-Lösung (0,85%), welche sterilisiert ist. Es ist zweckmäßig die Injektionsflüssigkeit so zu verdünnen, daß die Virusdosis stets in derselben Menge Flüssigkeit, z. B. in 5 ccm, enthalten ist. Man mißt also, um eine Dosis von 0,01 ccm zu präparieren, 0,02 ccm mit einer in Hundertstel ccm geteilten Pipette ab und setzt 10 ccm NaCl-Lösung hinzu, dann enthalten 5 ccm dieser Mischung die verlangte Dosis von 0,01.

Vor der Injektion überzeugt man sich nochmals davon, daß die in der Spritze befindliche Flüssigkeit absolut klar ist.

Die Injektion selbst geschieht in der üblichen Weise unter die Haut am Halse, und zwar hoch genug, so daß die etwa nachfolgende Injektion von Serum etwa eine Handbreit tiefer gegeben werden kann.

#### Herstellung des Serums.

Nachdem ich mich davon überzeugt hatte, daß man gesalzenen Pferden 20 und selbst 200 ccm von frischem virulenten Blut injizieren kann, ohne daß sie im geringsten dadurch beeinträchtigt werden, wurden solche gesalzene Tiere, welche zur Gewinnung von Serum präpariert werden sollten, von vornherein mit den größten Dosen behandelt. Anfangs wurde das virulente Blut, welches einem kranken Tiere möglichst kurze Zeit vor dem Tode entnommen ist, subkutan injiziert, später sind wir aber zur intravenösen Injektion übergegangen, weil dieselbe sich leichter ausführen läßt und weit bessere Resultate in bezug auf die Wirksamkeit des Serums gibt. Wir geben in der Regel 2 Liter intravenös.

Das dem kranken Tier entzogene Blut wird defibriniert, durch Gaze filtriert und sofort injiziert. Ist das Blut zu stark abgekühlt, dann muß es vorsichtig auf etwa 35° C im Wasserbade erwärmt werden.

Wenn während der Injektion die Respiration des Tieres unruhig zu werden beginnt, dann wird pausiert, bis die Störung vorübergegangen ist. Unter Umständen muß die Injektion abgebrochen werden, bevor 2 Liter vollständig injiziert sind. So haben wir einige Male aufgehört, als 1700 ccm eingeflossen waren, in einem Falle sind wir aber auch auf 2500 ccm gestiegen, ohne das Tier dadurch zu schädigen.

Die einzelnen Injektionen sind nicht vor 14 Tagen zu wiederholen. Als wir bei einem Tiere schon nach 7 Tagen wieder injizierten, wurde eine mäßige Hämoglobinurie beobachtet. Das ist aber auch das einzige Mal gewesen, daß dieses Symptom bei unseren fortifizierten Tieren vorgekommen ist.

Nach vier Injektionen kann man von den injizierten Tieren Blut zur Gewinnung von Serum entnehmen. Es geschieht dies 12 bis 14 Tage nach der letzten Injektion. Man kann dann Tieren 4 bis 5 Liter entziehen und dies drei- bis viermal in Zwischenräumen von einer Woche wiederholen.

Dann gibt man dem Tiere einige Monate Ruhe bei guter Pflege, injiziert wieder und gewinnt von neuem Blut.

Auf einen Punkt, welcher mir eine gewisse Bedeutung zu haben scheint, möchte ich besonders aufmerksam machen. Wir haben zum Fortifizieren nur alte Pferde, welche sich in gutem Ernährungszustand befinden, benutzt, und ich halte es für wahrscheinlich, daß dies der Grund dafür ist, daß das von uns präparierte Serum keine hämolytischen Eigenschaften besitzt. Bei Verwendung von jungen Tieren würde ich es für not-

wendig halten, das Serum, bevor es in größerer Menge verwendet wird, genau daraufhin zu prüfen, ob es nicht hämolytisch wirkt.

Wenn alte Tiere benutzt werden, hat man überdies den Vorteil, daß dieselben höchstwahrscheinlich immun sind gegen die Piroplasmosis der Pferde (Biliary fever), welche in Südafrika sehr verbreitet ist. Wir haben absichtlich mehrmals Blut, welches Piroplasmen in sehr geringer Zahl enthielt, injiziert und bei unseren alten Tieren niemals einen Ausbruch der Krankheit beobachtet. Ein junges Pferd dagegen, welches nur 20 ccm Blut von einem alten gesalzenen Pferde subkutan erhalten hatte, erkrankte nach einer Inkubationsfrist von 9 Tagen an Piroplasmosis und starb daran. Da diese Krankheit leicht mit Horse-sickness verwechselt werden kann und tatsächlich, wie die Literatur über Horse-sickness lehrt, schon mehrfach damit verwechselt ist, so sollte jeder, der über Horse-sickness arbeitet, sich genau vertraut machen mit den Symptomen derselben und mit dem mikroskopischen Blutbefund, welcher allein eine sichere Unterscheidung ermöglicht. In jedem zweifelhaften Falle muß eine mikroskopische Untersuchung des Blutes vorgenommen werden. Allerdings muß dieselbe sehr gründlich gemacht werden, auch erfordert sie viel Übung und Erfahrung, da die Parasiten meistens in sehr geringer Anzahl vorhanden sind und nicht immer die charakteristische Form der Piroplasmen zeigen, sondern unregelmäßige, den Malariaparasiten ähnliche Gestalt annehmen können. Wir haben bei unseren Tieren in fünf verschiedenen Fällen die Piroplasmosis angetroffen. Für die Verwendung des Serums kommt die Gefahr der Übertragung der Piroplasmosis nicht in Betracht, da das Serum behufs seiner Konservierung mit Substanzen versetzt wird, welche die Piroplasmen innerhalb von wenigen Tagen abtöten. Nur die Verwendung eines ganz frischen Serums könnte gefährlich werden.

Als Beispiele für die Fortifikation von gesalzenen Pferden, welche Serum liefern sollen, mögen folgende dienen:

Nr. 1	$\frac{4}{7}$	200 ccm	von Nr. 2	subkutan	
	$\frac{7}{8}$	2000	„ „ „	7	„
	$\frac{29}{8}$	2000	„ „ „	12	„ (enthält Piroplasm.)
	$\frac{13}{10}$	2000	„ „ „	24	intravenös
	$\frac{20}{10}$	2000	„ „ „	16	„
			$\frac{31}{10}$	Blutentnahme.	
Nr. 3	$\frac{4}{7}$	2000 ccm	von Nr. 2	subkutan	
	$\frac{7}{8}$	2000	„ „ „	7	„
	$\frac{29}{8}$	2000	„ „ „	12	„ (enthält Piroplasm.)
	$\frac{11}{9}$	Blutentnahme (das Serum zu schwach befunden).			
	$\frac{6}{10}$	2000 ccm	von Nr. 14	subkutan	
	$\frac{20}{10}$	2500	„ „ „	16	intravenös
			$\frac{1}{11}$	Blutentnahme.	
	$\frac{3}{12}$	2000 ccm	von Nr. 28	intravenös	(enthält Piroplasm.)
			$\frac{17}{12}$	Blutentnahme	
			$\frac{24}{12}$	„	
			$\frac{1}{1}$	„	
Nr. 8	$\frac{7}{8}$	1000 ccm	von Nr. 7	intravenös	
	$\frac{20}{8}$	1000	„ „ „	12	„ (enthält Piroplasm.)
	$\frac{13}{10}$	1700	„ „ „	24	„
	$\frac{20}{10}$	2000	„ „ „	16	„ (mäßige Hämoglob.)
			$\frac{2}{11}$	Blutentnahme.	
	$\frac{3}{12}$	1700 ccm	von Nr. 28	intravenös	(enthält Piroplasm.)

$\frac{16}{12}$  Blutentnahme

$\frac{23}{12}$  „

$\frac{31}{12}$  „

$\frac{7}{1}$  „

$\frac{24}{3}$  1500 ccm von Nr. 65 intravenös.

Um nun das Serum aus dem Blut zu erhalten und zu konservieren, wird folgendermaßen verfahren:

Das Blut wird sofort defibriniert, durch Filtration durch Gaze von den Blutgerinnseln befreit, in hohe Gefäße gefüllt und im Eisschrank stehen gelassen. Schon nach 24 Stunden haben sich die roten Blutkörperchen zu Boden gesenkt und das darüber stehende Serum kann abgegossen werden. Später scheidet sich noch weiteres Serum ab, welches am zweiten und selbst am dritten Tage noch gewonnen werden kann. Im ganzen erhält man von dem defibrinierten Blut nahezu 70% Serum. Zur Konservierung des Serums dient das von Ehrlich angegebene Verfahren. Es werden nämlich von einer Flüssigkeit, welche in 100 Teilen 20 Teile Glycerin und 5,5 Teile Phenol enthält, 10 Teile mit 90 Teilen Serum gemischt. Diese Serummischung wird zweckmäßigerweise in Gläser von 200 ccm Inhalt gefüllt und an einem kühlen, dunklen Orte aufbewahrt. Beim langen Stehen bildet sich in dem anfänglich leicht getrübbten und rötlich aussehenden Serum ein Bodensatz. Zur Injektion benutzt man nur die darüber stehende klare Flüssigkeit.

## Fourth Report on African Coast Fever.<sup>1)</sup>

By

Professor Koch.

Since the publication of my last Report, the method of protective inoculation therein recommended has been applied on a large scale to European and native-owned cattle, in order to ascertain how it was likely to answer in actual practice. These field experiments began in October 1903, and are still going on, and the result of the work done is tabulated on the accompanying returns, to which I append the following commentary.

List "A" shows the work done in the Victoria district. Operations, which commenced here on October 24th, were initiated by Chief Veterinary Surgeon Gray under my personal supervision, and subsequently kept up by Messrs. Readman, Hill, and Southey, and to the expeditious manner in which the work can be carried out, I can bear witness.

To obviate any difficulty which might be experienced in obtaining animals in Victoria suitable for inoculating from, five salted cattle from Hillside Camp, in whose blood the ring forms of the parasite were present, were sent on to await our arrival. These animals were subsequently supplemented by other suitable animals purchased locally.

A large proportion of the cattle in this district being owned by natives, before we left Bulawayo the Acting Native Commissioner, Mr. Forrestall, sounded native

<sup>1)</sup> Presented to the Legislative Council, 1904.

stockowners as to their willingness to have their cattle inoculated. The majority expressed themselves as anxious to have their animals treated, and as European farmers were equally unanimous in their desire to give the method a trial, little time was lost in making a start, and, thanks to the interest taken in the work by Mr. Forrestall, who accompanied us everywhere and acted as interpreter, we had no difficulty in making rapid progress, the presence of the Native Commissioner having a reassuring effect on the natives, who were at first inclined to look doubtfully on a method of inoculation in which blood was used.

The usual daily tale of animals inoculated in the first round at Victoria ranged between 200 and 400, depending upon the distance traversed between the various kraals. On several occasions Mr. Gray inoculated over 500 in a day, but such days were exceptionally heavy—300 head a day may be taken as a very fair average, and that number could only be got through comfortably when a considerable number of natives were present to catch and hold the animals so that no time was lost in going from one animal to another.

Shortly before the work began the rains commenced, and with the commencement of the wet weather the disease everywhere showed a tendency to revive. To such an extent was this the case that instead of having to inoculate, as we anticipated, a thousand head of cattle in order to include all animals in infected herds and their vicinity, we found that over four thousand had to be dealt with. In almost every direction we met cases of the disease, and microscopic examination of blood smears from sick and dead animals at Mangwendi's and Matchokoto's kraals, near the township, showed that the type of infection which prevailed was a severe one.

The history of the course of the disease in Victoria is much the same as in other districts. It was originally introduced a year ago by transport cattle from the north, first appearing on the Victoria-Enkeldoorn road; then the Commonage was infected, in spite of precautions taken to preserve its integrity by prohibiting the outspanning of transport cattle within its boundaries, and enforcing compulsory dipping of all animals entering the township.

Once the disease became established on the Commonage, it made a clean sweep of most of the cattle grazing there, and native stockowners residing some distance from town, who had cattle whose milk was sold in town, running at the kraals on the edge of the Commonage, took fright and moved their cattle from the vicinity of the infected area, in many instances carrying the disease with them to their own kraals, so when we arrived at Victoria we found the Commonage for the most part denuded of cattle, and beyond it a thickly stocked area where isolated outbreaks had occurred, surrounded in most cases by herds of cattle amongst which there had been no outbreaks, although some of these were probably already infected, and all were in imminent danger of becoming so by grazing in the vicinity of infected herds. The apparently clean herds were in such a precarious position that the natives willingly agreed to their being inoculated, and they were therefore included in the sphere of operations and helped to swell the sum total of animals treated.

Such herds, amongst which no cases of African Coast Fever had appeared, are classified on the return under two headings. Those in which the animals remained healthy during the inoculation period are characterised as "Clean Herds". Those in which isolated cases of the disease occurred shortly after inoculation began are shown as "Doubtfully Clean Herds".

That the mortality amongst "Doubtfully Clean Herds" is due not to inoculation but to veldt infection is readily apparent from a consideration of the position of the herds

included under this category in Return "B", the Chibi Return, for all the herds shown there under this heading are herds whose grazing veldt overlaps that of infected herds, therefore these herds are included in the general return (Sheet "D") amongst infected herds.

The third group on the returns headed „Infected Herds“ requires no explanation. It comprises herds infected at the time inoculation was begun.

Group No. 4 is shown as "Combined Infected and Clean Herds". These are herds in which the cattle owned by one individual or kraal were broken up into separate batches, some of which were clean and some infected. There are two lots of cattle of this description shown in the Bulawayo return (Sheet "C") and one in the Victoria return (Sheet "A"), and they are interesting and instructive in so far as inoculations were conducted simultaneously in both clean and infected herds, the same sample of blood being used for each.

Reference to List "A" shows that at Victoria thirty clean herds, containing 1,701 head of cattle, received up to date a maximum number of seven inoculations.

The addition to these of the clean herd of Chikanganga brings the total number of clean inoculated cattle in this district up to 1,809, amongst which the mortality up to the time of writing is nil.

To the number of cattle in infected herds shown as such in List "A", there must be added the cattle of "Doubtfully Clean Herds" and those of Chikanganga's infected herd. Summed up, the animals in these herds amount in all to 710 head, amongst which there have been 52 deaths. In most infected herds, so far, only isolated cases of disease have been recorded, although in a few instances (Bhututu, Mangwendi and Matchokoto) there has been a relatively high death rate, a circumstance to which I will refer later on.

Sheet "B", showing the work done in the Chibi District (35 miles from Victoria) calls for no special comment. This district was infected from Victoria, and the disease having appeared there more recently, inoculation was begun at a somewhat later date, so that six inoculations is the maximum number which has been made in this district. Otherwise the conditions are similar to those obtaining at Victoria. Here, 24 clean herds, comprising 1,228 cattle, are being inoculated without any mortality resulting so far. Besides these, ten infected herds, of 656, are also under treatment, amongst which there have been 16 deaths.

Sheet "C" shows work done in and around Bulawayo. The disease appeared here about 20 months ago, and while some parts of the district are highly infected, there are still a number of places in the vicinity of the town which are clean. Our opportunities of dealing with clean herds in this district were limited to two, one a herd belonging to Colonel Napier and the other a herd belonging to Mr. Heberden, which must be considered clean, although eight deaths from African Coast Fever had occurred in it a long time before inoculation commenced. The latter herd Mr. Heberden succeeded in freeing from the disease by moving it to fresh pasture after each outbreak. Such a line of procedure seems to me of great value, and recourse should be had to it whenever local conditions permit of movement without endangering the safety of neighbouring herds. Mr. Heberden's herd has been inoculated thirteen times and remains healthy.

I am sorry to say that in several instances cattlemen who began inoculating suspended operations after a few injections, because no immediate benefit was observable, although expectations that such would be forthcoming were scarcely justifiable, as I pointed out in my Third Report that good results need not be looked for when inoculation is applied to herds in which the disease has gained a thorough foothold.

As evidence of the futility of inoculation, public reference has frequently been



made to a herd belonging to Mr. Flemming, a farmer residing in the vicinity of Bulawayo, but that such a case does not demonstrate the inefficacy of the method can be clearly shown. The herd in question consisted of nine animals, the survivors of about 30, which were alive a year ago. These nine animals were first inoculated on October 15th, 1903. Four injections were made, and then the owner refrained from proceeding further with the experiment, because two or three weeks after the date of the first injection two animals died of African Coast Fever. How many more of the inoculated animals have since died I do not know, but last week blood smears taken from two calves belonging to the same individual were examined at the laboratory, and were found to give evidence of severe infection, and these animals in all probability have since died.

As a matter of fact, this herd should not appear in the Return at all, because inoculation operations were discontinued, but I include it lest the public should think that a record of this case was deliberately omitted because its outcome had not been satisfactory.

In this district, as at Victoria, we find instances (Erasmus and Fingo Location) in which owners have clean and infected lots of cattle which were inoculated simultaneously with the same blood without detriment to the healthy herds, which remain in perfect health.

Altogether, 378 animals in clean herds have been inoculated in and around Bulawayo without loss. Of infected herds, 312 head have been dealt with, of which 106 have died.

The sum total of the results of the experiment in the Bulawayo, Victoria, and Chibi districts, are shown in Return "D", and the conclusions to be drawn from our work so far are :—

1st. Inoculation is devoid of danger, therefore cattle may be inoculated without any risk being incurred.

2nd. In infected herds, a mortality of about 10 per cent. has occurred during the period of inoculation.

If we wish to arrive at some estimate from a consideration of these figures of the number of animals that have died because the recommended method has failed to protect them, the following facts must be borne in mind :—

1st. The method is protective, not curative. For this reason, all deaths occurring within twenty-eight days of the first inoculation must be excluded, as animals dying within that period were probably infected before treatment began, allowing for an incubative period of fourteen days in such cases, and a similar period for the duration of the disease.

2nd. Immunity does not begin immediately after the first inoculation. The time required for the establishment is greater than I at first supposed. The experiments made at Hillside Camp show that animals turned into a highly infected pasture will not resist the infection after eight weeks' treatment, and I now think that the immunising effect of the process is only beginning at the end of that time, and requires at least four or five months before it is completed, therefore any death occurring within three months of the date of the first inoculation cannot be attributed to the inefficacy of the process, because such deaths, in all probability, have occurred amongst animals which have become infected before they have been eight weeks under treatment.

Looked at from this standpoint, the results obtained in infected herds assume quite a different aspect, as consideration of a detailed account of the few cases in which we were able to obtain precise information tends to show.

The cases to which I allude are those of Bhututu, Mangwendi, and Matchokoto, in the Victoria district; and that of the Fingo Location, in the neighbourhood of Bulawayo.

I will take first that of Bhututu. The herd at Bhututu's kraal originally consisted of about 100 head of cattle. In the course of four or five months, 70 animals died, and the surviving 26 were inoculated for the first time on October 24th. Of this severely infected herd, three animals died during the next three months; that is, within the period which precedes the development of immunity.

Next in order is Mangwendi's herd. This herd consisted originally of 73 animals grazing in the immediate vicinity of Bhututu's Kraal. Seventeen animals died before inoculation began, and at the time of the first inoculation we found one animal dead and two sick, both highly infected. The two which were sick died during the week, and are included in the mortality return. Within the first two months of inoculation 13 died including the two aforementioned. During the month of January (the third month after the commencement of inoculation) 12 more dropped off.

In Matchokoto's herd, which originally contained about 50, 16 only were alive 10 days prior to inoculation, and on the day of inoculation seven were left (four adults and three calves) one of which was very sick and died the following day. Since then four more have died, leaving two survivors out of a herd of 50. No good result was anticipated from the inoculation of this herd, and it might very well have been left alone, but it was considered advisable to inoculate, as the natives were desirous that their cattle should be treated.

At the Fingo Location near Bulawayo, cattle to the number of about 650 were running when the disease first appeared amongst a lot of 437. Of this infected herd 350 died previous to October 21st, the date upon which inoculation began. During the month of October 18 died. How many of these died prior to inoculation I could not ascertain, therefore all are shown in the mortality return. In the month of November there were 14 deaths, in December four, and in January 13. Of all these we really ought to reckon that only those dying in the last week of January died in spite of inoculation.

I think a careful consideration of the detailed cases of Bhututu, Mangwendi, Matchokoto, and the Fingo Location makes it clear that not more than a small percentage of the total mortality of 10 per cent. shown as having occurred in infected herds, can be said to have happened, because the animals had not benefitted by the recommended treatment.

I do not contend, however, that the result of our field experiments prove that the method so far has afforded a high degree of protection of the stock which have been subjected thereto. Sufficient time has not elapsed for this to be apparent.

Our work only shows that the establishment of artificial immunity is a much more gradual process than I at first hoped it would be.

With regard to the suitability of animals for inoculating from, we find comparatively little difference in the effect produced by the blood of various animals with which we carried out our inoculation, but more marked benefit appeared to be derived by the use of blood drawn from animals which had recovered from a real attack. Our experiments also show that five cubic centimetres of defibrinated blood is a sufficient quantity for each injection, and a regular system of fortnightly inoculations I find is best. By the preliminary weekly injections recommended in my former Report, I hoped to hasten the establishment of immunity, but I am now convinced that it is impossible to force the process.

I feel certain that in the course of the next few months proofs of increased immu-

nity in inoculated herds will be forthcoming, therefore I strongly recommend the continuance of the field experiments already begun, modifying the original process by using five cubic centimetres of recovered blood instead of 10, and allowing an interval of a fortnight between each injection.

It is a matter for regret that immunity is established so slowly, but the method recommended is satisfactory in this respect, that once animals are thoroughly immunised no further treatment will be necessary, for they will be permanently immune, and their progeny after contracting the disease in a mild form, will also resist further infection.

While I have called attention in previous reports to the fact that this disease has only been found in Rhodesia, in the Transvaal, and on the African Coast, it is of great interest to note that Dschunkowsky in No. 4 of the "Centralblatt für Bakteriologie" lately published, describes a disease prevalent in the Russian Transcaucasus, which is very probably identical with African Coast Fever, judging from the train of symptoms described as occurring in infected animals, and from the drawings given of the specific parasite. I think it is not improbable that a more extended search will show that the disease is much more widely distributed than we at first supposed.

#### Conclusions.

I will close these Reports on African Coast Fever by stating briefly the conclusions which may be drawn from a consideration of our experiments and observations so far as these are of interest in enabling us to understand the nature of the disease, and so far as they suggest what steps should be taken to combat its spread.

1st. African Coast Fever is a cattle disease caused by a characteristic blood parasite, and cases of the disease can be readily identified by a demonstration of the specific organism.

2nd. It is different from Texas Fever or so-called Redwater which was introduced into and spread widely over South Africa before the advent of African Coast Fever.

3rd. African Coast Fever may be combined with Redwater, and hæmoglobinuria (blood-coloured urine) is only observed in such cases. It was the occurrence of cases of mixed infection of this class which rendered the identification of the disease so difficult when it first came into this country.

4th. The disease did not originate in Rhodesia, but was introduced from the coast.

5th. It is not transferable directly, and sick animals can be stabled with healthy ones without communicating the disease.

6th. The disease can only be spread by ticks. In this respect it resembles Texas Fever.

7th. The mortality from African Coast Fever is very high, the loss in an infected herd commonly amounting to 90 per cent.

8th. Animals which survive are protected against second attacks, and so long as they remain on infected veldt their immunity continues. That this is the case and that the progeny of such animals are protected to a certain degree and become immunised by mild attacks of the disease during infancy, a consideration of the Coast Fever areas on the East Coast of Africa proves.

9th. In the manner referred to in paragraph 8 a really immune stock will be evolved in any country in which the disease appears.

10th. Immune animals are not free from parasites. There are always a small number of ring-shaped or ovoid parasites in the blood of such animals.

11th. By the transfer of parasites from salted to healthy animals by ticks, the disease can be produced in a virulent form. This fact explains the mysterious infection of healthy stock by recovered and apparently healthy animals if herded together on the same veldt. The introduction of susceptible animals into a pasture over which salted animals have grazed and dropped ticks may suffice to infect them, although they never come into actual contact with the immune herd.

12th. It is impossible to produce the disease by single injections of blood drawn from a sick animal and containing the parasite, although this can be readily done in Texas Fever.

13th. Repeated injections into healthy animals of blood containing parasites, at intervals of fourteen days, produce a very mild infection characterised by a slight rise of temperature, and the appearance of a few parasites in the blood. By such mild attacks, animals so treated become immune after four or five months.

14th. For immunising purposes the blood of a recovered animal can be used if the parasites are present, but care should be taken to see that such blood is free from the parasites of other South African diseases such as trypanosoma and spirilli.

15th. Inoculation *per se* can do no harm if ordinary care is taken to conduct the operation in a cleanly manner.

16th. A clean herd be protected by careful isolation from suspects, particularly from such animals as have had the disease and recovered from it. For this purpose fencing is beneficial.

17th. The destruction of ticks by spraying or dipping is advantageous, and helps to check the spread of the disease, particularly when combined with fencing. The discovery of a certain and safe method of destroying all ticks, which so far we have not at our command, would arrest any further spread of the disease.

18th. After the disease has appeared in a herd, movement of such a herd to clean veldt from time to time, particularly after outbreaks is beneficial, and will sometimes suffice to free it from infection if the conditions are favourable.

19th. Clean veldt is only such veldt upon which neither sick nor recovered animals have grazed for at least twelve months.

20th. Such expedients as fencing, dipping, spraying and moving animals, have only a temporary value, as sooner or later the disease will extend to and involve all herds in the vicinity of an infected centre, as Texas Fever did, therefore such precautions should be supplemented by inoculation with recovered blood whenever disease appears in the vicinity.

21th. The artificial establishment of immunity takes from four to five months. It is devoid of risk, inexpensive, and when animals are fully immunised no further treatment is necessary. Until this stage is reached animals should be protected as far as possible by spraying, fencing and periodical movement.

B u l a w a y o , 29th February 1904.

## Annexure A.

## List of Cattle inoculated in the Victoria District.

## I. Clean Herds.

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Chikaranda . . . . .	35	7	0
Mchunedza . . . . .	39	7	0
Maranyama . . . . .	28	7	0
Msara . . . . .	50	7	0
Mgwesi . . . . .	87	7	0
Petzer . . . . .	22	7	0
Kruger and Cloete . . . . .	39	7	0
Du Ploy . . . . .	16	7	0
Struthers . . . . .	32	7	0
Zugwara . . . . .	26	6	0
Uushi . . . . .	60	6	0
Chibcangela . . . . .	59	6	0
Umboni . . . . .	20	6	0
Ningi . . . . .	30	6	0
Vungudziri . . . . .	79	6	0
Chakona . . . . .	25	6	0
Gabagena . . . . .	33	6	0
Phillips . . . . .	53	6	0
Abadi . . . . .	51	6	0
Umtimri . . . . .	90	6	0
Shebabalibi . . . . .	60	6	0
Namuroki . . . . .	74	4	0
Gaba . . . . .	23	4	0
M'faire . . . . .	39	4	0
Ungunza . . . . .	65	4	0
Manchure . . . . .	41	4	0
Chevana . . . . .	40	4	0
Gobo . . . . .	76	4	0
Williams . . . . .	275	7	0
Erskine . . . . .	134	7	0
30 herds . . . . .	1,701	...	0

## II. Doubtfully clean Herds.

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Clark . . . . .	23	7	1
Baramasumba . . . . .	105	7	3
	128	...	4

**Annexure A. — Continued.**

**Cattle inoculated in Victoria District. — Continued.**

**III. Infected Herds.**

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Bhututu . . . . .	26	7	3
Mangwendi . . . . .	59	7	25
Matchokoto . . . . .	7	7	5
Makumbo . . . . .	20	7	1
Matchurguli . . . . .	6	7	1
Mawafa . . . . .	5	7	0
Vundusi . . . . .	17	7	7
Mkoko . . . . .	103	7	1
Chiringaringa . . . . .	117	7	2
Nagina . . . . .	78	7	2
Umtima . . . . .	61	7	3
	499	...	47

**IV. Combined infected and clean Herds.**

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Chikaganga—			
One lot on infected veldt . . .	93	7	1
One lot on clean veldt . . .	108	7	0
	201	...	1

## Annexure B.

## List of Cattle inoculated in the Chibi District.

## I. Clean Herds.

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Tshaglomkona . . . . .	64	6	0
Mapendui . . . . .	75	6	0
Massalu . . . . .	71	6	0
Thiromwa . . . . .	62	6	0
Basutus . . . . .	27	6	0
Tshirone . . . . .	14	6	0
Maweracre . . . . .	24	6	0
Masorodsu . . . . .	152	6	0
Masikidan . . . . .	40	6	0
M'Gere . . . . .	9	6	0
Masikiduckraal . . . . .	4	6	0
Mangwana . . . . .	35	3	0
M'Nimo . . . . .	52	3	0
M'Tange . . . . .	41	3	0
M'Zonda . . . . .	26	3	0
Marshala . . . . .	54	3	0
Tshigadsa . . . . .	57	3	0
M'Konese . . . . .	45	3	0
M'Subukwa . . . . .	105	3	0
Chibassa . . . . .	82	3	0
Masina . . . . .	6	3	0
M'Tamberi . . . . .	94	3	0
Tahorouru . . . . .	30	3	0
Tipapansi . . . . .	59	3	0
24 herds . . . . .	1,228	...	0

## II. Doubtfully clean Herds.

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Mapoubiru . . . . .	96	6	2
Sabelabe "2" . . . . .	31	6	1
Tarn . . . . .	150	6	4
Tianga . . . . .	85	6	1
Mokotose . . . . .	83	6	1
Chibi . . . . .	45	6	1
Dumbo . . . . .	45	6	1
Shuru . . . . .	76	3	1
	611	...	12

**Annexure B. — Continued.**

List of Cattle inoculated in the Chibi District. — *Continued.*

III. Infected Herds.

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Tom . . . . .	30	6	1
Sabelabe "1" . . . . .	15	6	3
	45	...	4

**Annexure C.**

List of Cattle inoculated in the Bulawayo District.

I. Clean Herds.

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Napier . . . . .	30	6	0
Heberden . . . . .	112	13	0
	142	...	0

II. Infected Herds.

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Hull . . . . .	66	4	0
Bett . . . . .	32	7	28
Flemming . . . . .	9	4	4
Helm . . . . .	24	7	4
Essexvale . . . . .	62	7	3
	193	...	39

III. Combined infected and clean Herds.

	Number of Cattle	Number of Inoculations	Number of Deaths since first Inoculation
Erasmus—			
1. Lot on infected veldt . . . . .	32	9	18
2. Lot on clean veldt . . . . .	24	9	0
Fingo Location—			
1. Lot on infected veldt . . . . .	87	9	49
2. Lot on clean veldt . . . . .	212	8	0
	355	...	67



**Annexure D.**

## Clean Herds.

	Number of Cattle	Number of Deaths
Victoria District . . . . .	1,509	0
Chibi District . . . . .	1,228	0
Bulawayo District . . . . .	378	0
	3,115	0

## Infected Herds.

	Number of Cattle	Number of Deaths
Victoria District . . . . .	720	52
Chibi District . . . . .	656	16
Bulawayo District . . . . .	312	106
	1,688	174