

An

den Direktor der Kolonial-Abteilung des Auswärtigen Amts.

Berlin, den 27. Februar 1901.

Ew. Hochwohlgeboren beehre ich mich unter Rückgabe des Berichtes des Roßarztes **R i c k m a n n**, betreffend Viehseuchen in Südwestafrika, über die **Immuni- sierungsversuche gegen das Texasfieber** ergebnis folgendes zu berichten.

Derartige Versuche sind in den letzten Jahren mehrfach ausgeführt. Namentlich ist dies geschehen in Nordamerika, Australien und in Argentinien. Am bemerkenswertesten sind wohl die in Australien angestellten Versuche, weil sie sich über einen längeren Zeitraum erstrecken und in großem Umfange durchgeführt sind. Sie sind in einem Bericht des Dr. **F r a n k T i d s w e l l** (Report on Protective inoculation against tick fever, Sydney 1899) beschrieben. Aus diesem Berichte geht hervor, daß in Australien zum Immunisieren das Blut von Tieren genommen wird, welche die Krankheit vor einigen Wochen überstanden haben. Wenn solches Blut Rindern unter die Haut gespritzt wird, dann erkranken sie mehr oder weniger leicht an Texasfieber. Es können sogar einige Tiere dabei verloren gehen. Die Verluste sind aber verhältnismäßig gering, nur 3—4%, wenn die Impfung bei jungen Tieren, in kühler Jahreszeit und nicht mit mehr als 5 ccm Blut gemacht wird. Dieser ersten Impfung folgen noch eine zweite mit 10 ccm desselben Blutes und schließlich eine dritte mit virulentem Blute, d. h. mit Blut, welches von einem noch in der Krankheit befindlichen Tiere genommen ist. Es geschieht dies, um die künstliche Immunisierung möglichst zu verstärken und von längerer Dauer zu machen. Diese Methode der Immunisierung entspricht vollkommen den bisherigen Erfahrungen über derartige Schutzimpfungen. Sie wird wohl kaum eine wesentliche Verbesserung erfahren und hat sich bereits an vielen Tausenden von Rindern bewährt. In den anderen oben erwähnten Ländern hat man sie mit unbedeutenden Modifikationen nachgeahmt. Auch im Kaplande hat man sich, wie aus dem Berichte des Dr. **H u t s c h e r n** hervorgeht, an dieselbe gehalten und ich würde raten, dasselbe in Deutsch-Südwestafrika zu tun. Die von Herrn **R i c k m a n n** vorgeschlagene Kombination derselben mit Anwendung von Immunserum halte ich für eine unnötige Komplikation, von welcher keine besseren Resultate zu erwarten sind.

An den Herrn Minister der geistlichen, Unterrichts- und Medizinalangelegenheiten.

Berlin, den 17. November 1902.

Eurer Exzellenz beehre ich mich ganz gehorsamst zu melden, daß die Untersuchungen über die **Verwertung der Agglutination zur Diagnose der Rotzkrankheit** ihren Abschluß gefunden haben.

Beim Beginn der Untersuchungen standen nur wenige frühere Arbeiten über Rotz-agglutination zur Verfügung, welche zu einer vorläufigen Orientierung hätten dienen können.

M. F a d y a n hatte in bezug auf die Anwendbarkeit der Methode nur zweifelhafte Resultate erhalten.

Einige Untersuchungen, welche teils von Bourges und Mery, teils von Wladimirow und Nocard herrühren, ergaben, daß Blutserum rotzkranker Pferde in einer Verdünnung von 1 : 1000—2000 agglutinierend wirkt, daß aber auch das Serum normaler Pferde dieselbe Eigenschaft besitzt, jedoch nur in einer Verdünnung von 1 : 200—300.

In einer späteren Arbeit gaben Bourges und Mery an, daß mit Wahrscheinlichkeit, aber nicht mit Sicherheit, auf Rotzkrankung geschlossen werden könne, wenn das Serum in einer Verdünnung von 1 : 300 oder darüber die Rotzbazillen agglutiniert. Denn in der Regel agglutiniert das Serum von rotzfreien Pferden die Rotzbazillen nur in einer Verdünnung von 1 : 200.

Jensen (Kopenhagen) prüfte die Methode an 29 rotzfreien und einem rotzigen Pferde, und zwar im Vergleich mit der Malleinprobe. Bei den rotzigen Pferden erhielt er mit beiden Methoden ein positives Resultat. Bei einem von den rotzfreien Tieren mit Mallein ein positives und mit der Agglutination ein negatives Resultat. Die übrigen rotzfreien Pferde reagierten weder auf Mallein, noch auf Agglutination. Er kommt deswegen zu dem Schluß, daß, soweit sein geringes Material dazu berechtige, die Agglutinationsprobe weit zuverlässiger sei als die Malleinprobe. Bei der von ihm angewandten Probe agglutinierte das Serum des rotzkranken Pferdes bei Verdünnung von 1 : 20 und 1 : 50 stark. Die Sera der rotzfreien Pferde agglutinierten überhaupt nicht.

Nikolkly erhielt mit dem Serum rotziger Pferde bei Verdünnungen von 1 : 6 bis 1 : 50 typische Agglutinationen, bei stärkeren Verdünnungen nicht mehr.

Nach Alfanasieff agglutiniert normales Serum bis 1 : 400, Rotzserum bis 1 : 1600. Als Durchschnittswerte, welche für die Rotzdiagnose ausschlaggebend sein sollen, werden von ihm 1 : 450 bis 1 : 850 hingestellt. Er machte seine Untersuchungen an 18 rotzkranken und 8 gesunden Pferden.

Pokchichewsky fand an 16 gesunden Pferden, daß das Serum bei 1 : 300 nicht mehr agglutinierte, während es bei 8 rotzkranken Pferden noch bei 1 : 1000 Agglutination gab. Er beobachtete die Agglutination mit dem Mikroskop; mikroskopisch agglutinierte das Rotzserum nicht über 1 : 500.

Rabieaux, welcher ebenfalls das Mikroskop benutzte, kam bei seinen Untersuchungen an 9 rotzkranken und 11 rotzfreien Pferden zu dem Schlusse, daß Rotz vorhanden ist, wenn die Agglutination bei einer Verdünnung von 1 : 500 und darüber positiv ausfällt.

Die Angaben dieser Autoren sind so widersprechend, daß sie nur verwirren, aber nicht orientierend wirken können. Es blieb daher weiter nichts übrig, als ganz von vorn anzufangen.

Es wäre zunächst festzustellen, wie sich das Agglutinationsphänomen bei den Rotzbazillen überhaupt gestaltet, um auf Grund der hierbei gemachten Beobachtungen sowie unter Benutzung der an anderen Bakterien in bezug auf Agglutination gewonnenen Erfahrungen eine zuverlässig arbeitende Methode zu konstruieren.

Zu diesem Zweck verschaffte ich mir mehrere Stämme von Rotzbazillen, welche in bezug auf ihre Virulenz, ihr Wachstum auf verschiedenen Nährböden und sonstige Eigenschaften sorgfältig untersucht wurden.

Alsdann wurde der Versuch gemacht, verschiedene Tiere, nämlich Esel, Ziegen, Kaninchen mit Hilfe von abgetöteten Rotzkulturen zu immunisieren und sie dahin zu bringen, daß ihr Blutserum agglutinierende Eigenschaften annahm.

Selbstverständlich mußte das Serum dieser Tierspezies auch daraufhin geprüft werden, ob es nicht bereits im normalen Zustande die Fähigkeit hat, die Rotzbazillen zu agglutinieren, was in der Tat der Fall ist. Nämlich das Serum normaler Esel agglu-

tiniert die Rotzbazillen bis zu einer Verdünnung von 1 : 50, normales Ziegenserum agglutiniert dieselben bis 1 : 20, normales Kaninchenserum ebenfalls bis 1 : 20.

Durch das angewandte Immunisierungsverfahren, welches darin bestand, daß den Tieren durch Erhitzen auf 60° (drei Stunden lang) abgetötete Kulturen zuerst subkutan und später intravenös beigebracht wurden, steigerte sich das Agglutinationsvermögen schon innerhalb weniger Wochen ganz bedeutend. Am besten gelang dies bei Ziegen, von denen ein Tier so weit gebracht wurde, daß sein Serum die Rotzbazillen bei einer Verdünnung von 1 : 5000 agglutinierte. Mit diesem hochagglutinierten Serum wurden dann die weiteren Versuche angestellt, um ein den Verhältnissen in der Praxis möglichst entsprechendes Verfahren zu finden.

Vor allen Dingen kam es mir darauf an, festzustellen, ob es nicht möglich sei, an Stelle der lebenden Rotzbazillen die abgetöteten benutzen zu können. Die hierüber angestellten Versuche gaben durchaus befriedigende Resultate. Durch Erhitzen auf 60° während 4 Stunden werden die Rotzbazillen, wenn sie sich in Flüssigkeiten aufgeschwemmt befinden, ganz sicher abgetötet. Die auf solche Weise abgetöteten Bazillen werden nun aber genau ebenso stark zum Agglutinieren gebracht wie die lebenden aufgeschwemmten Bazillen. Es ist dies für die Verwendbarkeit der Agglutinationsprobe in der Praxis geradezu von entscheidender Bedeutung, da ich das fortwährende Manipulieren mit lebenden Rotzbazillen für so gefährlich halte, daß, wenn sich dasselbe nicht vermeiden ließe, das Verfahren von vornherein hätte als unbrauchbar erklärt werden müssen.

Damit die Agglutination immer gleichmäßig ausfällt, ist es notwendig, daß die zu agglutinierenden Bakterien immer in demselben Mengenverhältnis mit dem agglutinierenden Serum gemischt werden. Bisher war man in der Weise verfahren, daß in eine geeignete Nährflüssigkeit die Rotzbazillen ausgesät und einige Tage bei Blutwärme gehalten wurden. Die so erhaltene Kultur wurde dann ohne weiteres zum Agglutinieren benutzt. Dies Verfahren ist nicht zweckmäßig, weil die Kulturen niemals gleichmäßig ausfallen.

Es wurden deswegen die Rotzbazillen nicht in flüssigem, sondern auf einem festen Nährboden kultiviert und dann erst in einer passenden Flüssigkeit sorgfältig verteilt. Von sonstigen Bedingungen, welche einzuhalten sind, wenn möglichst genaue Resultate erzielt werden sollen, ist noch folgendes zu erwähnen. Die Mischungen von Aufschwemmung der Rotzbazillen mit dem zu prüfenden Serum müssen immer auf ein nahezu gleich großes Quantum von Flüssigkeit eingestellt werden.

Die Proben werden 18—20 Stunden lang im Brutapparat bei 37° gehalten und dann geprüft.

Die Prüfung soll mikroskopisch höchstens noch unter Zuhilfenahme einer Lupe vorgenommen werden, aber nicht bei stärkeren Vergrößerungen. Die bedeutenden Abweichungen in den Angaben der früheren Untersucher beruhen sehr wahrscheinlich darauf, daß dieselben mit ungleichen Kulturen gearbeitet haben, nach verschieden langer Zeit und bei verschiedener Vergrößerung ihre Beobachtungen gemacht haben.

Die Herstellung der Testflüssigkeit, d. h. der Rotzbazillenaufschwemmung, gestaltet sich also folgendermaßen.

Es werden in Reagenzröhrchen im erstarrten Glycerinbouillonagar von Rotzbazillen, welche auf Reinheit sorgfältig geprüft sind, Kulturen angelegt, welche nach zwei- bis dreitägigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37° stark entwickelt sein müssen.

Diese Kulturen sind 4 Stunden lang in einem Wärmekasten bei 60° zu halten.

Dann wird die Bakterienmasse mit einer Karbol-Kochsalzlösung (Kochsalz 0,85, Acid. carbol. liquefact. 0,5, Aq. dest. ad 100,0) abgespült und sorgfältig in der Flüssig-

keit verrieben. Auf ein Agarröhrchen nimmt man etwa 10 ccm Flüssigkeit. Diese stark getrübe Aufschwemmung wird durch ein gewöhnliches Papierfilter (dünne Qualität) gegossen. Die so erhaltene konzentrierte Testflüssigkeit hält sich im Eisschrank, aufbewahrt, etwa 14 Tage lang unverändert. Für den Gebrauch wird sie, nachdem ein etwa vorhandener Bodensatz aufgeschüttelt ist, auf das Fünffache verdünnt, so daß von einem Agarröhrchen 50 ccm verdünnte Testflüssigkeit erhalten wird, welche zur Agglutinationsprobe fertig ist.

Die Agglutination selbst wird in folgender Weise ausgeführt.

Um das zu prüfende Serum innerhalb der gewöhnlichen Grenze zwischen 1 : 100 und 1 : 1000 zu untersuchen, stellt man sich zwei Verdünnungen desselben mit physiologischer Kochsalzlösung her, 1 : 10 und 1 : 40, bringt abgemessene Mengen davon in Reagenzröhrchen und fügt verdünnt Testflüssigkeit in folgenden Verhältnissen hinzu.

	Verdünntes Serum	Verdünnte Testflüssigkeit	Verhältnis der Mischung
1 : 10	0,1 ccm	1,0 ccm	1 : 100
	0,05 „	1,0 „	1 : 200
	0,1 „	1,0 „	1 : 400
1 : 40	0,1 „	1,5 „	1 : 600
	0,05 „	1,0 „	1 : 800
	0,04 „	1,0 „	1 : 1000.

Zur Kontrolle dient ein Röhrchen mit 1,0 verdünnter Testflüssigkeit ohne Serumzusatz. Sämtliche Röhrchen kommen dann in den auf 37° eingestellten Brutapparat und bleiben in demselben 18—20 Stunden. Im Kontrollröhrchen zeigt sich nach dieser Zeit ein gleichmäßiger, feiner, lockerer Bodensatz, die darüberstehende Flüssigkeit ist schwach opaleszierend.

Die Röhrchen, in denen Agglutination eingetreten ist, enthalten dagegen ein kompaktes, an den Rändern scharf begrenztes Gerinnsel, das meist unregelmäßige, oft sternförmige Ausläufer hat. Bei stärkeren Graden der Agglutination ist die darüber befindliche Flüssigkeit völlig geklärt, doch genügt zu einem positiven Ausfall der Agglutination eine deutliche Gerinnselbildung, welche sich bei Betrachtung des Röhrchens von unten her im Vergleich mit den Kontrollröhrchen am sichersten erkennen läßt.

Nachdem dieses Verfahren, bei dessen Ausarbeitung Herr Dr. Neufeld, Assistent des Instituts für Infektionskrankheiten, mir wesentliche Dienste geleistet hat, nach allen Richtungen erprobt und hinreichend eingeübt war, konnten wir daran gehen, Pferde daraufhin zu untersuchen, inwieweit ihr Serum die Fähigkeit besitzt, die Rotzbazillen zu agglutinieren.

Selbstverständlich mußte mit gesunden oder vielmehr rotzfreien Pferden begonnen werden.

Zu dieser Untersuchung wurden zum größten Teil Tiere verwendet, welche auf dem Schlachthof geschlachtet waren. Daneben aber auch einige Pferde, welche im Institut für Immunisierungszwecke gehalten werden. Im ganzen konnten 49 Serumproben untersucht werden.

Das Resultat war folgendes:

Sämtliche Sera agglutinierten mindestens in einer Verdünnung von 1 : 100, die meisten bei 1 : 200 bis 1 : 300, bei drei Tieren zeigte sich sogar noch Agglutination bei 1 : 400.

Es fragte sich nun, wie sich die rotzkranken Pferde verhalten würden.

Zur Beantwortung dieser Frage bot sich schon bald Gelegenheit.

In Wolmsdorf bei Bolkenhain war ein Rotzfall gemeldet. Der dorthin geschickte Tierarzt Schmidt brachte das Serum von den gemeldeten und von zwei verdächtigen Tieren desselben Bestandes nach Berlin.

Bei der Untersuchung ergab sich für das

Serum von Pferd I	1:1000
„ „ „ II	1: 800
„ „ „ III	1:2000.

Pferd I war kurz nach der Besichtigung und Probeentnahme seiner Krankheit erlegen, die beiden anderen wurden getötet.

Bei der Obduktion wurde gefunden:

bei Pferd I: Haut-, Lungen-, Kehlkopf-, Luftröhren- und Nasenrotz,

bei Pferd II: Lungen-, Kehlkopf- und Nasenrotz,

bei Pferd III: Haut- und Lungenrotz.

Das Serum von drei rotzkranken Pferden hatte somit eine erheblich höhere Agglutination ergeben als dasjenige von rotzfreien Tieren.

In einem zweiten Fall, welcher einen Rotzausbruch unter den Pferden der Posthalterei in Potsdam betraf, gestalteten sich die Verhältnisse ähnlich.

Aus diesem Pferdebestand war ein Tier zum Schlachten verkauft und als rotzkrank ermittelt. Es wurde eine tierärztliche Untersuchung angeordnet und dabei noch ein verdächtiges Tier gefunden, welches eine geschwollene Kehlganglymphdrüse hatte. Unter den übrigen 26 Pferden konnten klinische Symptome nicht festgestellt werden. Es wurde nun das Serum des verdächtigen und der mit ihm in demselben Stalle befindlichen oder sonst damit in Berührung gekommenen Pferde untersucht.

Bei dem verdächtigen Pferde wurde eine Agglutination von 1 : 2000 nachgewiesen. Aber auch bei zwei anderen, anscheinend völlig gesunden Pferden agglutiniert dies Serum die Rotzbazillen ebenso hoch, d. h. bis 1 : 2000.

Das verdächtige Pferd wurde getötet und durch die Obduktion Lungenrotz nachgewiesen.

Der Tötung der beiden anderen Pferde widersetzten sich der Departementstierarzt und der Kreistierarzt, weil außer der Agglutinationsprobe nicht die geringsten Anzeichen für Rotz vorhanden waren. Es erforderte ziemlich umständliche Verhandlungen, um die Erlaubnis zur Tötung zu erhalten. Schließlich konnten die Tiere getötet und obduziert werden. Herr Geheimrat S c h ü t z fand bei beiden ausgedehnte rotzige Veränderungen in den oberen Luftwegen und Lungen.

Nach diesen ersten außerordentlich günstigen Ergebnissen sah es so aus, als ob die Agglutinationsprobe ein untrügliches Erkennungsmittel für Rotz sein müsse. Leider hat sich diese Hoffnung später nicht bewährt, da sich ziemlich viele Ausnahmen sowohl in bezug auf die Agglutinationsfähigkeit der rotzfreien als auch der rotzkranken Pferde ergeben haben.

Es wurden bisher im ganzen 627 Pferde aus vielen verschiedenen Beständen untersucht. Den Bericht über diesen Teil der Untersuchungen hat Herr Geheimrat S c h ü t z übernommen. Aus einer von ihm mitgeteilten Zusammenstellung der Resultate geht hervor, daß unter den 627 Pferden 34 rotzkrank gefunden wurden.

Von diesen zeigten Agglutination:

1:2000	10 Pferde
1:1000	9 „
1: 800	5 „
1: 600	4 „
1: 400	6 „

Andererseits agglutinierte das Serum von nicht rotzigen Pferden in einer Verdünnung von

1 : 200—400	bei 526	Pferden
1 : 600	„ 55	„
1 : 800	„ 12	„

Eine scharfe Unterscheidung zwischen rotzkranken und rotzfreien Pferden konnte also nicht erhalten werden, da bei den rotzfreien Tieren die Agglutinationsfähigkeit bis 1 : 800 anstieg und bei den rotzkranken bis 1 : 400 herabging.

Für die Zwecke der Praxis würde die Grenze für die Rotzdiagnose durch die Agglutinationsprobe bei 1 : 800 zu setzen sein, weil bei dieser Annahme 70,6% der rotzkranken Tiere und nur 2% rotzfreie Pferde getroffen würden. Ich halte es aber nicht für wahrscheinlich, daß bei einer Fortsetzung der Versuche dieses Verhältnis infolge von Zunahme der Sicherheit bezüglich der Diagnose sich günstiger gestalten wird.

Wegen der leichten Ausführbarkeit der Agglutinationsprobe, wegen der geringen Belästigung der Pferdebesitzer, denen nur die Blutentnahme bei den Tieren und keine mehrtägige Außerdienststellung ihrer Pferde wie bei der Malleinprobe zugemutet wird, sowie wegen der unbedeutenden Kosten, welche dadurch beansprucht werden, kann auch jetzt schon die Agglutinationsprobe in der Praxis vorteilhaft Verwendung finden, wenn es darauf ankommt, über das Vorhandensein von Rotz in einem Pferdebestand eine schnelle und vorläufige Orientierung zu gewinnen.

Der Direktor des Kaiserlichen Gesundheitsamtes wandte sich am 22. Januar 1881 an den deutschen Konsul in Rio de Janeiro mit dem Ersuchen, ihm Präparate zum Studium von **Gelbfieber** und **Cholera** zu übersenden. Für die Auswahl der dazu verwertbaren Objekte hatte Koch folgende Anweisung ausgearbeitet.

Um Material, welches zur Untersuchung auf pathogene Organismen geeignet ist, zu gewinnen, wird folgendes Verfahren zweckmäßig sein.

1. Leichenmaterial:

Damit das Resultat der Untersuchung nicht zu sehr vom Zufall beeinflusst werde, ist es erforderlich, das Material von mindestens fünf verschiedenen, akut verlaufenden und unzweifelhaften Cholera- resp. Gelbfieberfällen, und zwar von jeder Leiche sämtliche unten näher bezeichneten Objekte, zu entnehmen.

Auch ist das Material nur dann verwertbar, wenn die Sektion kurze Zeit nach dem Tode, womöglich wenige Stunden nach demselben vorgenommen ist.

Einem jeden Organ sind 2—3 Stücke von 1—2 ccm, also ungefähr Daumengliedgröße, zu entnehmen und sofort in absoluten Alkohol zu legen, um sie möglichst schnell zu härten. Für sämtliche von einer Leiche gesammelten Objekte bedarf es eines Gefäßes mit einem Inhalt von 2 Litern absoluten Alkohol. Der Boden des Gefäßes ist mit einer mehrfachen Schicht Filtrierpapier zu bedecken und die Flüssigkeit mit den darin befindlichen Objekten von Zeit zu Zeit umzuschütteln, auch nach Ablauf der ersten 24 Stunden der Alkohol einmal zu erneuern. Spätestens nach 8 Tagen sind die Teile genügend gehärtet und können zur bequemeren Verpackung in ein Stück Gaze oder Musselin (die Teile jeder einzelnen Leiche für sich zusammen) gebunden und mit einer entsprechenden Etikette versehen werden. Diese einzelnen Bündel würden dann in ein mit absolutem Alkohol gefülltes Blechgefäß kommen, welches zugelötet und in eine mit Sägespreu oder ähnlichem Stoff ausgefüllte Kiste zu stellen wäre.