



Ueber die Ätiologie des Wundstarrkrampfs

mit besonderer Berücksichtigung der Abhandlung von

Vaillard und Vincent: "

Contribution à l'étude de l'étiologie du Tétanos.

Aus dem hygienischen Institut zu Marburg.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

in der

Medicin, Chirurgie und Geburtshülfe

bei hoher

medizinischer Facultät der Universität Marburg

eingereicht von

Ernst Klipstein

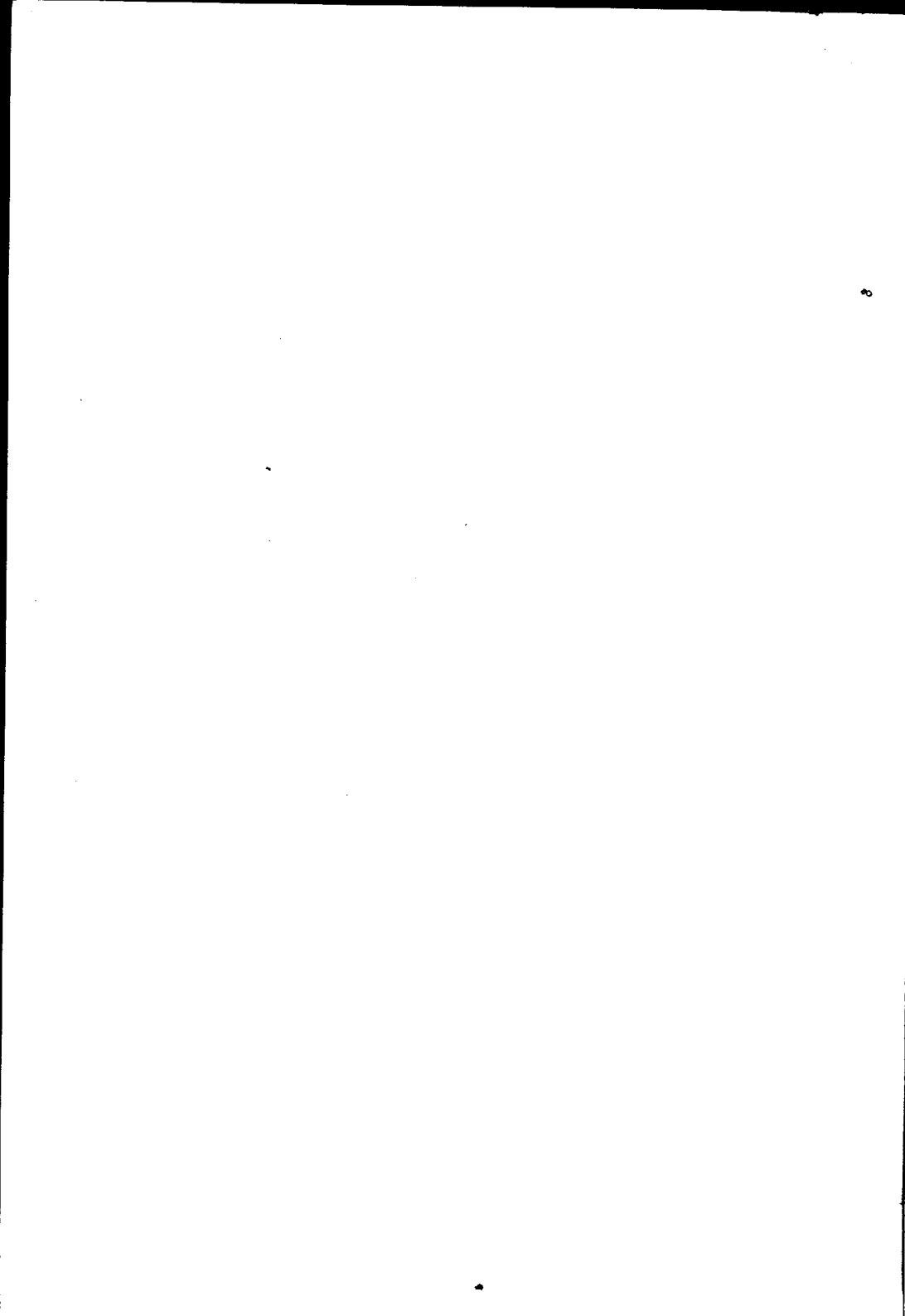
aus Vöhl.



MARBURG.

Buchdruckerei von Joh. Hamel.

1892.



Der Wundstarrkrampf, tetanus traumaticus, ist eine Krankheit, über deren Wesen erst die neueren bacteriologischen Untersuchungen Klarheit geschaffen haben. Früher hielt man ihn für eine periphere Nervenentzündung, die von den in der Wunde liegenden Nervenenden ihren Anfang nehme und allmählich bis zu den Wurzeln des Rückenmarks fortschreite. Die Entzündungsursache suchte man in einer Quetschung oder sonstigen durch die Verletzung selbst bewirkten Läsion der Nerven, oder auch in dem Druck, den in der Wunde stecken gebliebene Fremdkörper, wie Glasscherben, Holzsplitter, Kugelstückchen u. s. w. auf die Nerven ausübten.

Für diese Auffassung führte man 2 Gründe an: Einmal das häufige Vorkommen von Tetanus nach Verletzungen besonders nervenreicher Gegenden, wie der palma manus, der planta pedis, sodann die im Beginn der Krankheit in den verletzten Extremitäten oft auftretenden ziehenden Schmerzen.

Eine Aenderung der alten Anschauung machte sich in den sechziger Jahren bemerkbar. Man verlegte den Sitz der Krankheit in centrale Organe, in die Medulla oblongata und das Rückenmark und begann eine infectiöse Ursache zu vermuten. Die Richtigkeit dieser Vermutung wurde bestätigt durch die italienischen Forscher Carle und Rattone, die im Jahre 1884 bewiesen, dass der Tetanus übertragbar sei. Sie verimpften Eiter aus der Wunde eines an Tetanus erkrankten Menschen auf Kaninchen, die zum grössten Teil

unter ausgesprochenen Symptomen des Wundstarrkrampfs zu Grunde gingen.

Kurz darauf gelang es Nicolaier in Göttingen ¹⁾, durch subcutane Application von Gartenerde bei Mäusen, Meer-schweinchen und Kaninchen typischen Tetanus hervorzurufen. In dem Eiter, der sich an der Impfstelle bildete, fand er regelmässig neben anderen Mikroorganismen ein schlankes mit einer endständigen, glänzenden Spore versehenes Stäbchen. Impfungen mit dem Eiter auf Mäuse und Kaninchen bewirkten wiederum Tetanus. Auf Grund dieser Versuche erklärte Nicolaier die Bacillen mit den Köpfchensporen für die Erreger des Tetanus. Da ihm aber die Züchtung in Rein-kultur nicht gelang, blieb seine Behauptung unbewiesen.

Im Jahre 1886 stellte Rosenbach in Fällen von natürlich entstandenem Tetanus beim Menschen das Vor-handensein des Nicolaierschen Bacillus fest.²⁾ Viele Forscher bestätigten seine Angaben, andere aber, besonders Wide-mann und Flüge konnten den genannten Bacillus im Wundeiter tetanischer Menschen und Versuchstiere nicht auffinden und zweifelten deshalb an seiner ursächlichen Bedeutung.³⁾ Nicht ohne Berechtigung; denn, war der Ba-cillus nicht in allen Krankheitsfällen nachweisbar, so schien er zum Zustandekommen der Affektion unnötig zu sein, und die mit Eiter, der den Bacillus enthielt, vorgenommenen erfolgreichen Impfungen konnten durch andere in dem Impf-material enthaltene Bakterien oder sonstige mit übertragene Krankheitsstoffe bedingt sein.

1) Beiträge zur Aetiologie des Wundstarrkrampfs. von Nicolaier. Göttingen. 1885. Inaugural-Dissertation.

2) Rosenbach. Zur Aetiologie des Wundstarrkrampfs beim Men-schen. Centralblatt für Bacteriologie, Bd. I.

3) Widemann. Beitrag zur Aetiologie des Wundstarrkrampfs. Zeitschrift für Hygiene. Bd. V. S. 522. — Flüge, Anmerkung zu vor-stehendem Beitrag. Ebenda. Bd. V. S. 525.

Kitasato's Verdienst ist es, den unanfechtbaren Beweis geliefert zu haben, dass der von Nicolaier zuerst beschriebene Mikroorganismus der Erreger des Tetanus ist. Ihm gelang, was andere vergebens versucht hatten, den Bacillus zu isoliren, ihn in künstlichen Nährböden zu züchten und durch Uebertragung von Reinkulturen auf empfängliche Tiere das typische Krankheitsbild hervorzurufen. In einer im Jahre 1889 in der Zeitschrift für Hygiene erschienenen Abhandlung theilte Kitasato sein interessantes Verfahren der Isolirung mit.¹⁾ Mit dem Wandciter eines an Tetanus gestorbenen Menschen impfte er einige Mäuse, die sämtlich unter tetanischen Erscheinungen zu grunde gingen. Der Eiter der Impfstelle, in dem ausser anderen Mikroben die bekannten Stäbchen mit endständigen Sporen nachweisbar waren, wurde auf erstarrtes Blutserum oder Agar gebracht und im Brutschrank gelassen. Es entwickelte sich ein Gemisch verschiedenartiger Bakterien, von denen aber nur eine Art in den ersten 24—48 Stunden Sporen bildete — die Nicolaierschen Bacillen. Die grosse Resistenz der Sporen gegen Hitze bot nunmehr ein Mittel zur Trennung von den sporenfreien Keimen. Durch einstündiges Erhitzen auf 80° C. wurden letztere getödet, und nur die Sporen blieben lebend zurück. In Gelatine, die mit diesem Material geimpft war, fand kein Wachsthum von Bakterien statt, wenn sie nach dem gewöhnlichen Verfahren auf Platten gegossen wurde; wohl aber bildeten sich Colonien, wenn man die Gelatine in luftdicht geschlossene Glasgefässe goss, in welche vorher Wasserstoff geleitet war. Es handelte sich also um einen anaëroben Mikroben. Nach den für diese gebräuchlichen Methoden legte Kitasato weitere Kulturen an, die, nachdem sie genügend gewachsen waren, sich als durchaus rein er-

1) Kitasato, Ueber den Tetanusbacillus. Zeitschrift für Hygiene, Bd. VII, 1889.

wiesen und mit positivem Ergebnis zu Impfungen von Tieren benutzt wurden.

Die gleichen Kulturen wurden wiederholt direkt aus Wundeiter oder aus in die Haut eingedrungenen Holzsplittern tetanuskranker Menschen gewonnen.

Die Tetanusbacillen sind nach Kitasato obligat anaërob, nach Vaillard und Vincent¹⁾ indes gedeihen sie auch bei mässigem Sauerstoffzutritt, ohne viel von ihrer Virulenz einzubüssen. Geeignete Nährböden sind schwach alkalische, Pepton und Kochsalz enthaltende Bouillon, Agar und Gelatine, Medien, denen man zweckmässig noch 1—2 % Traubenzucker oder andere reduzierende Stoffe zusetzt. Weniger gut entwickeln sich die Bacillen in organischen Flüssigkeiten, in Eiereiweiss, humor aqueus, in frischem flüssigem Blutserum. Sie bilden in diesen Nährsubstraten wenig Sporen und zeigen Involutionsformen. Aber die Virulenz der Kulturen ist trotzdem eine grosse.

Die auf Platten unter Sauerstoffabschluss gewachsenen Kolonien, die bei Zimmertemperatur um den fünften Tag sichtbar werden, bestehn ähnlich wie die Kolonien des Heubacillus aus einem dichten Centrum mit einem helleren Rande, der aus lauter zierlichen, radiär verlaufenden Strahlen zusammengesetzt ist.

In der Stichkultur in hoher Traubenzuckergelatine, die bei Zimmertemperatur gehalten wird, bleibt der obere Teil des Impfstichs zunächst unfruchtbar, längs des unteren macht sich nach etwa einer Woche eine Bakterienwucherung bemerkbar, von der viele seitliche Ausläufe ausgehen, sodass jetzt die Kultur das Aussehn eines breitästigen Tannenbaums hat. Vom 10. Tage an beginnt von unten herauf die Verflüssigung der Gelatine, die allmählich den ganzen Nährboden

1) Vaillard et Vincent, Contribution à l'étude de l'étiologie du tétanos. Annales de l'institut Pasteur, Bd. X, Paris 1891.

beteiligt. Nunmehr klärt sich der obere Teil des Probirröhrchens, während sich der Boden mit einer wolkigen grauen Bacillenmasse bedeckt.

In hohem Agar und in Traubenzuckerbouillon unter Wasserstoff bei Brüttemperatur bemerkt man meist schon nach 24 Stunden die beginnende Entwicklung der Kultur, in der bald reichliche Gasbildung stattfindet und die sich durch einen eigentümlichen unangenehmen Geruch auszeichnet. Die Bouillon wird, sobald das Wachstum begonnen hat, trübe und undurchsichtig. Die Gasentwicklung bewirkt einen Ueberdruck im Innern des Gefässes, sodass der verschliessende Pfropfen herausgeschleudert oder gar der Kolben zertrümmert werden kann, wenn man nicht öfter die Gasblasen nach aussen entweichen lässt. Die Trübung der Bouillon nimmt von Tag zu Tag zu, nach etwa 14 Tagen aber hört die Kulturentwicklung auf, der obere Teil der Nährflüssigkeit wird wieder klar, und auf dem Boden des Gefässes bildet sich ein Absatz, der aus Stäbchen und Sporen besteht.

Die Tetanusbacillen wachsen am raschesten und üppigsten bei einer Temperatur von 36—38 ° C. Bei 20—25 ° wird die Kulturentwicklung erst am 3. oder 4. Tage, bei 18—20 ° erst nach einer Woche deutlich. Bei Temperaturen unter 14 ° findet kein Wachsthum statt, wohl aber noch bei 42 oder 43 °. Die meisten der Bacillen bilden dann allerdings keine Sporen mehr, sie bekommen ein körniges Aussehn, färben sich schlecht und zeigen allerhand Involutionsformen. Die Sporenbildung erfolgt bei Brüttemperatur schon nach 30 Stunden, um den 10. Tag findet man meist nur noch Sporen tragende Bacillen und freie Sporen. In Gelatinekultur bei 20—25 ° entstehen Sporen etwa nach einer Woche, wenn die Verflüssigung schon begonnen hat.

Die Tetanuskulturen bewahren, vor Licht und Luft geschützt, lange Zeit ihre Lebensfähigkeit. Noch nach sechs Monaten sind sie virulent und wachsen üppig, wenn man

sie auf neuen Nährböden überträgt. Oeftere Uebertragung auf neue Nährböden hat nicht, wie bei manchen pathogenen Bakterien, eine Verminderung der Virulenz zur Folge.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Kulturen sieht man im Beginn des Wachstums nur schmale, ziemlich lange, „borstenförmige“ Stäbchen, die teilweise einzeln liegen, teilweise zu langen Fäden vereinigt sind.

Der Moment der Sporenbildung zeigt sich dadurch an, dass das eine Ende des Bacillus kuglig anschwillt. Im Innern dieser Anschwellung erscheint bald die runde, glänzende Spore umgeben von einem schmalen, matten Hof, welcher bei Färbung die Farbe des Bacillenleibes annimmt. Das dünne Stäbchen mit der endständigen, dickeren Spore hat das Aussehen eines Trommelschlägers oder einer Stecknadel.

Färben lassen sich Tetanusbacillen mit den gebräuchlichen Anilinfarben und nach der Methode von Gram. Auch das Verfahren der Doppelfärbung für Sporen ist anwendbar.

Der Tetanusbacillus ist deutlich, aber schwach beweglich. Die Eigenbewegung hört auf, sobald die Anschwellung des einen Endes zum Zweck der Sporenbildung beginnt.

Die Sporen sind dauerhafte Gebilde. Im getrockneten Zustande bewahren sie lange Zeit Virulenz und Keimfähigkeit. So zeigten sich Sporen, die Kitasato an Seidenfäden antrocknen liess, dann einige Tage im Exsiccator über Schwefelsäure und schliesslich in freier Luft aufbewahrte, noch nach Monaten virulent. Ebenso verhielten sich Kulturen, die er unter vorher sterilisirte in einem Blumentopf befindliche Erde gemischt hatte. Nach Versuchen von Vaillard und Vincent verlieren Sporen, die an Fliesspapier antrocknet bei freiem Luftzutritt der Einwirkung der Sonnenstrahlen und des diffusen Lichts ausgesetzt werden, nach 12—30 Tagen ihre Virulenz. Auch die Luft allein, bei Abschluss des Lichts wirkend, schädigt allmählich die Sporen und tötet sie schliesslich, allerdings in einem längeren Zeitraum. —

Dagegen vermag das Licht ohne Mitwirkung des Sauerstoffs der Luft in mehreren Monaten einen erheblich schädigenden Einfluss auf die Sporen nicht auszuüben. — Indem sie diese Versuchsergebnisse auf die natürlichen Verhältnisse übertragen, glauben die genannten französischen Forscher, dass die Tetanuskeime im Innern des Bodens günstige Bedingungen für ihre Erhaltung finden, dass sie aber auf der Oberfläche ausgebreitet unter dem Einfluss des Lichts und des Sauerstoffs der Luft rasch pathogene Eigenschaft und Leben einbüßen. In der That gelang es, aus Erdarten der Oberfläche Bakterienkulturen zu züchten, die sich morphologisch von Tetanuskulturen nicht unterschieden, aber nicht pathogen waren. Ob es sich wirklich um Tetanusmikroben, die ihrer Virulenz verlustig gegangen waren, handelte, ist zweifelhaft, da Versuche die verlorene Virulenz wieder zu erzeugen misslangen.

In gewöhnlichem, wie in sterilisiertem Wasser erhalten sich die Tetanuskeime nach den Angaben von R. Schwarz¹⁾ lange Zeit virulent ($\frac{1}{2}$ Jahr und darüber): im Meerwasser geht die pathogene Eigenschaft bald verloren. In feuchtem Zustande können die Sporen eine Temperatur von 80 ° C. sechs Stunden lang, von 90 ° C. zwei Stunden lang ertragen; durch Erhitzen auf 100 ° C. im Dampfkochtopf werden sie in 5—8 Minuten getötet.

Auch gegen Chemikalien sind die Sporen ziemlich widerstandsfähig. Kitasato fand, dass sporenhaltige Seidenfäden in 5% Carbolsäure eingetaucht erst nach 15 Stunden die Keimfähigkeit verlieren, in einer Mischung von 5% Carbolsäure mit 0,5% Salzsäure schon in 2 Stunden, in 1‰ Sublimat in 3 Stunden und in einer Mischung von 1‰ Sublimatlösung mit 0,5% Salzsäure schon in 30 Minuten. Zu etwas anderen Resultaten kamen Tizzoni und Fräulein

¹⁾ Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde, Bd. XI, Seite 668 und 416.

Cattani.¹⁾ In ihren gemeinschaftlich ausgeführten Versuchen vermochten mineralische und organische Säuren in erheblicher Konzentration, zum Beispiel 5%. Carbolsäure, durch 24stündige Einwirkung die Lebensfähigkeit sporenhaltiger Kulturen kaum zu schädigen. 5%. Kreolin, Jodwasser, 5%. Carbolsäure mit 5%e. Salzsäure gemischt, 1%. Kaliumpermanganat töteten erst in 5—10 Stunden die Keime. 1‰. Sublimatlösung allein oder mit 0,5% Salzsäure gemischt wirkte in 2—3 Stunden desinfizierend, 1%. Sublimatlösung und eine Mischung von 1‰. Sublimatlösung mit 5% Carbolsäure und 0,5% Salzsäure in 10 Minuten. Am wirksamsten war Silbernitrat, das in einprozentiger Lösung in einer Minute, in einpromilliger in 5 Minuten die Sporen tötete. Jodoform, das von Sormani auf Grund von Tierexperimenten zur Desinfizierung von tetanusverdächtigen Wunden empfohlen wird,²⁾ ist nach Tizzoni ganz unwirksam.

Die Verschiedenheit der Angaben Kitasatos und Tizzonis ist nicht auffallend. Sie bestätigt nur die Erfahrung, dass der Grad des Widerstandsvermögens gegen äussere Einflüsse bei Sporen derselben Art, die verschiedener Herkunft sind, ein wechselnder ist. Auch das Alter der Kulturen, die Temperatur, bei der sie sich entwickelt haben, der mehr oder weniger günstige Nährboden bedingen Unterschiede in der Resistenz der Keime.

Zu Tierversuchen benutzt man gewöhnlich weisse Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen. Eine vollvirulente Bonillenkultur bewirkt bei Mäusen in der geringen Menge, die von einer Platinöse gefasst wird, mit Sicherheit eine tödliche Erkrankung, zur Tötung eines Meerschweinchens genügt nach Vaillard oft schon $\frac{1}{500}$ Kubikcentimeter, Kaninchen er-

1) Tizzoni und Cattani, Ueber die Widerstandsfähigkeit der Tetanusbacillen gegen physikalische und chemische Einwirkungen. Centralblatt für Bacteriologie, VIII, 1890. S. 562.

2) Centralblatt für Bacteriologie. Bd. VII, 1890.

fordern $\frac{1}{2}$ –1 Kubikcentimeter. Tauben, Hühner und Hunde sind wenig empfänglich. Sie reagiren nur auf Einführung grosser Mengen Impfmateri als mit tetanischen Erscheinungen, die oft lokal bleiben. Auch Schafe, Esel und Pferde, Tiere, die spontan öfter erkranken, sind zu Versuchszwecken geeignet.

Man kann Tetanus übertragen durch Einbringung des Virus in eine Wunde, durch Einspritzung unter die Haut oder in die grossen Körperhöhlen oder direkt in die Venen. Auf dem Wege des Intestinal- und des Respirationstrakts kommt die Infektion nicht zustande. Die Inkubationsdauer schwankt — je nach der Empfänglichkeit der Tierart oder des Individuums, der Virulenz und Menge des eingeführten Impfmateri als — zwischen 1–8 Tagen. Bei Mäusen und Meerschweinchen beträgt sie in der Regel 12–24 Stunden, bei Kaninchen 2–8 Tage. Bei subkutaner Applikation zeigt sich die starre Lähmung zuerst an der Muskelgruppe, die der Impfstelle benachbart ist, ja kann auf diese beschränkt bleiben, wenn die angewandte Dosis sehr klein war. Gewöhnlich aber schreitet der Prozess weiter. Nach Lähmung einer Extremität wird die gleichnamige starr, die anliegenden Muskelpartien werden beteiligt, schliesslich geht die Starre auf den ganzen Körper über und unter Konvulsionen, die bei äusseren Reizen besonders heftig werden, erfolgt der Tod infolge der Lähmung der Athemmuskeln.

Von vornherein allgemein ist der Tetanus nach Impfung in die Bauchhöhle oder in eine Vene. Auf eine lange Dauer der Inkubationszeit folgt gewöhnlich auch eine lange Dauer der Krankheit, die dann nicht selten mit Genesung endigt. Eine kurze Inkubationszeit ist prognostisch ungünstig.

Bei der Sektion von Tieren, die durch Impfung mit einer Reinkultur zu grunde gegangen sind, findet man ausser einer geringfügigen Hyperämie und Infiltration der Impfstelle keine pathologischen Veränderungen. Bacillen sind in den inneren Organen und im Blut durch kein Verfahren nachweisbar. An

der Impfstelle sind sie immer vorhanden. Wenn sie auch der direkten mikroskopischen Untersuchung öfter entgehen, so gelingt doch stets die Anlegung von Kulturen mittelst Gewebstückchen oder Exsudat oder Eiter von der Impfstelle. Die Tetanusbacillen dringen also nicht durch die Blutbahn in die Organe des Körpers ein, sie bleiben an der Impfstelle, wo sie sich, wenn überhaupt, nur kurze Zeit vermehren; denn einige Zeit nach der Impfung sind sie immer nur in ganz geringer Anzahl nachweisbar.

Das rein örtliche Auftreten der Mikroben bei der Verbreitung der Krankheitserscheinungen über den ganzen Körper, die geringe Anzahl der Keime zu der Zeit, in welcher die Krankheit deutlich in die Erscheinung tritt und ihren Höhepunkt erreicht, sind Thatsachen, die uns zu der Annahme nötigen, dass die Krankheitserscheinungen durch giftige Stoffwechselprodukte der Tetanusbacillen bewirkt werden, die von der Impfstelle aus in das Blut aufgenommen werden und ihre toxische Wirkung ausüben, wenn die Bacillen selbst zum grössten Teil schon aus dem Körper verschwunden sind. In der That gelingt es, wie zuerst Knud Faber¹⁾ gezeigt hat, mittelst keimfreier Bakterienprodukte, die durch Filtration von Kulturen mittelst Chamberlandseher Filter gewonnen werden, das typische Krankheitsbild hervorzurufen.

Umfangreichere Untersuchungen über Wirkung und Eigenschaften des keimfreien Filtrats veröffentlichte Kitasato.²⁾ Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen, die er in grosser Anzahl mit Filtrat impfte, boten genau die gleichen Krankheitserscheinungen dar und gingen in derselben Zeit zu grunde, wie Tiere, die zur Kontrolle gleiche Mengen von Kultur er-

1) Faber, Knud, Die Pathogenese des Tetanus. Centralblatt für Bacteriologie, VIII, 1890, S. 773.

2) Kitasato, Experimentelle Untersuchungen über das Tetanusgift. Zeitschrift für Hygiene, Bd. X, 1891.

halten hatten. Am empfindlichsten gegen das Tetanustgift zeigten sich die Meerschweinchen. Gaben von 0,01—0,001 Kubikcentimeter Filtrat wirkten auf sie schon tödlich. Mäuse ertrugen relativ grössere Mengen, und Kaninchen waren am widerstandsfähigsten. Dies Ergebnis entspricht dem bei Anwendung von Kulturen gewonnenem.



Die Wirkungen der Filtrate verschiedener Bonillonkulturen sind keineswegs gleichstark. Nach Kitasato begünstigt eine schwach alkalische oder neutrale und frischbereitete Traubenzuckerbouillon ein üppiges Bakterienwachstum und liefert das wirksamste Filtrat, von dem zuweilen schon 0,000005 Kubikcentimeter genügen, um eine Maus zu töten. In stark alkalischer und alter Bonillon dagegen sollen die Bacillen schlecht wachsen und ein verhältnismässig schwaches Gift erzeugen. Auch Vaillard hebt den Einfluss des Nährbodens auf die Wirksamkeit des produzierten Gifts hervor. Nach seinen Untersuchungen aber ist gerade das Filtrat von Kulturen, die sich spärlich entwickelt haben, besonders wirksam. Kulturen in Bouillon, der Pepton und Traubenzucker zugesetzt waren, wuchsen zwar sehr üppig, aber sie lieferten ein schwächer wirkendes Gift, als Bakterien, die in Bouillon ohne jene Zusätze gezüchtet wurden.

Annähernde Berechnungen der Menge des im Filtrat enthaltenen Gifts zeigen, dass man es mit einem ungemein differenten Körper zu thun hat. Kitasato wog die feste Substanz und fand, dass 0,0153 Milligramm derselben die tödliche Dosis für ein Kilo lebendes Tier sein würde. Vaillard und Vincent, die den Trockenrückstand veraschten und durch Bestimmung des dadurch entstandenen Gewichtsverlustes das Gewicht der organischen Substanz feststellten und es ihrer Berechnung zu grunde legten, fanden, dass 0,025 Milligramm zur Tötung eines Meerschweinchens genügen würde. Es ist klar, dass die tödliche Dosis des

reinen Gifts noch geringer sein muss; denn die organische Substanz enthält neben dem Gift jedenfalls noch andere Stoffe.

Was die Widerstandsfähigkeit des Tetanusgifts gegen äussere Einflüsse anlangt, so vermag es hohe Hitzegrade nicht zu ertragen. Eine Temperatur von 65 ° C. zerstört es in 5 Minuten, von 60 ° C. in 20 Minuten. Durch geringere Wärmegrade oder kürzer dauerndes Einwirken der genannten Temperaturen wird die Wirksamkeit erheblich verringert. Schon ein längerer Aufenthalt im Brutschrank bewirkt eine deutliche Abschwächung. (Kitasato.) Im kalten, dunklen Raum erhält sich das Filtrat viele Monate. Dagegen verliert es am Fenster bei zerstreutem Tageslicht allmählich seine Wirksamkeit, die nach zehn Wochen fast gänzlich erloschen ist. Bei direkter Einwirkung des Sonnenlichts ist schon nach $\frac{1}{2}$ Stunde die Wirkung des Filtrats schwächer, nach 15—18 Stunden völlig aufgehoben.

Dieser Einfluss des Lichts kann sich bei Luftabschluss nicht geltend machen. Filtrat, welches vierzehn Tage lang diffusem Licht und 50 Stunden dem Sonnenlicht ausgesetzt war, fand Vailard noch voll wirksam. Gegen Mineralsäuren und gegen Alkalien ist das Gift stark empfindlich. Durch einen Zusatz von 0,55% Salzsäure, 0,1% Aetzkalk, 0,3% Natronlauge wird es in einer Stunde völlig zerstört. Die gleiche Wirkung hat 0,5% Jodtrichlorid und 1% Kresol.

Zu welcher Gruppe chemischer Körper gehört das Tetanusgift? Früher hielt man es auf grund der Untersuchungen Briegers für ein Alkaloid, ein Ptomain. Brieger vermochte nämlich, ehe noch die Reinkultivirung des Tetanusbacillus geglückt war, aus Mischkulturen neben zwei anderen giftigen Produkten einen krystallinischen Körper basischer Natur, das Tetanin, darzustellen, der Tiere unter tetanusähnlichen Erscheinungen tötete. Denselben Körper erhielt er aus dem frisch amputirten Arm eines an Wundstarrkrampf Erkrankten.

Weyl und Kitasato ¹⁾ wiederholten die Briegerschen Untersuchungen mit Benutzung von Reinkulturen. Aus gehacktem Fleisch, das sie mit Kulturen beschickten, gewannen sie geringe Mengen salzsauren Tetanins, das bei Mäusen in Gaben von 0,033 bis 0,05 Starre der hinteren Extremitäten, vermehrte Sekretion aus Mund und Nase und schliesslich Tod bewirkte, ein Meerschweinchen dagegen in der Dosis von 0,525 nur vorübergehend krank machte, ohne dass tetanische Erscheinungen beobachtet wurden. Noch einen zweiten basischen Körper, das Tetanotorin, stellten sie nach Briegers Angaben dar. Die Quantität, die sie von ihm erhielten, war sehr gering. Mäusen injicirt erwies er sich zwar als giftig, konnte aber nicht die charakteristischen Symptome des Wundstarrkrampfs hervorrufen. Man wird dieser Substanz also keinen wesentlichen Einfluss auf das Zustandekommen der Krankheit zuschreiben. Ebenso kann das Tetanin nicht die Bedeutung beanspruchen, die ihm ursprünglich beigelegt wurde. Man vergleiche nur die geringe zur Tötung eines Meerschweinchens erforderliche Menge Filtrat, die nur 0,01—0,001 Kubikcentimeter beträgt, mit der grossen Dosis des Tetanins, die einem Meerschweinchen, ohne es zu töten oder nur tetanisch zu machen, injicirt werden konnte.

Muss man da nicht auf die Vermutung kommen, dass die Tetanusbacillen neben den Briegerschen Alkaloiden noch eine oder mehrere Substanzen viel stärkerer Giftigkeit erzeugen, auf deren Rechnung die wesentlichsten Krankheitserscheinungen zu schreiben sind?

Wirklich konnten Brieger und C. Fränkel aus Filtrat von Tetanusbouillonkulturen eine besondere Art von Körpern darstellen, die durch Alkohol gefällt wurden, in Wasser leicht löslich waren, in ihrem chemischen Verhalten

1) Kitasato und Weyl, Zur Kenntniss der Anaëroben. Zeitschrift für Hygiene, Bd. VIII, 1890, S. 404.

den Eiweisskörpern gleichen und in sehr geringer Menge das typische Bild des Wundstarrkrampfs hervorriefen.¹⁾ Ähnliche Stoffe werden von vielen Mikroorganismen erzeugt, zum Beispiel von den Erregern der Diphtherie, der Cholera, des Thyphus. Es scheint, dass man ihre Bildung als einen wesentlichen Teil der Lebensthätigkeit pathogener Bakterien in dem von ihnen befallenen Organismus zu betrachten hat. Wegen ihrer eiweissähnlichen Natur und wegen ihrer Giftigkeit haben Brieger und C. Fränkel sie als Toxalbumine bezeichnet. Im Körper sollen sie unmittelbar aus dem Gewebs-eiweiss entstehen, das von den Bakterien so umgewandelt wird, dass es toxische Kraft erhält. In unsern künstlichen Kulturen sollen die Toxalbumine aus den Eiweisskörpern des Blutserums gebildet werden, oder auch aus dem Pepton durch Rückbildung in Eiweiss.

In den Toxalbuminen oder ähnlichen Stoffen hat man also wohl die wichtigsten giftigen Erzeugnisse der Tetanus-bacillen zu erblicken.

Eine andere Auffassung vertreten die italienischen Forscher Tizzoni und Cattani,²⁾ sowie die Franzosen Vaillard und Vincent. Dass das Tetanusgift ein unmittelbarer Abkömmling der Eiweisskörper sei, nehmen auch sie an. Im Gegensatz zu den deutschen Autoren aber glauben sie, dass es eine Art Enzym oder lösliches Ferment sei. Für diese Ansicht werden verschiedene Gründe angeführt. Die leichte Zerstörbarkeit der toxischen Substanz durch die Hitze, durch die Wirkung der Luft und des Lichts, ihre Unlöslichkeit in Alkohol, der Umstand, dass sie in sehr geringer Menge die tödliche Krankheit bewirkt, dass diese Wirkung bei Einführung per os ausbleibt — diese und andere

1) L. Brieger und C. Fränkel, Untersuchungen über Bacteriengifte, Berliner klinische Wochenschrift 1890, Nr. 11.

2) Tizzoni und Cattani, Ueber das Tetanusgift, Centralblatt, VIII, 1890, S. 69.

Thatsachen werden nach dem Vorbild der Untersuchungen von Roux und Yersin über das Diphtheriegift als Beweise für die fermentähnliche Natur des Gifts betrachtet.

Demgegenüber betont Fränkel mit Recht, dass von dem Tetanusfiltrat immer eine bestimmte Menge zur Erzielung der Giftwirkung erforderlich sei, dass es eine nach Empfänglichkeit und Grösse des Tiers wechselnde tödliche Dosis gebe, unter die man nicht herabgehen dürfe, wenn nicht der Erfolg ausbleiben solle. Für die Fermente aber sei gerade die Unabhängigkeit der Wirkung von der Menge der angewandten Substanz charakteristisch.

Wie verbreitet sich das Tetanusgift im Körper und wie kommt seine Wirkung zustande?

An der Impfstelle wird es von den Körpersäften gelöst, gelangt in die Blutbahn und durchströmt nun den Organismus. Sein Vorhandensein im cirkulirenden Blut wies Nissen direkt nach, indem er einem an Wundstarrkrampf erkrankten Menschen noch während des Lebens durch Venäsektion Blut entnahm, das Tiere unter den charakteristischen Krankheitserscheinungen tötete.¹⁾

Wie rasch das Gift in den Körper eindringt, zeigen Versuche von Kitasato und von Vaillard.

Ersterer, der Mäuse an der Schwanzwurzel impfte, die Impfstelle nach $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$ u. s. w. Stunden herauschnitt und die Wunde ausbrannte, sah nur die eine halbe Stunde nach der Impfung operirte Maus gesund bleiben.

Vaillard injicirte einer Ratte einen Tropfen Filtrat in das Ende des Schwanzes und schnitt ihn $\frac{3}{4}$ Stunde später zwei Centimeter oberhalb ab. Das Tier erkrankte und starb ebenso schnell, wie ein Controlltier.

1) Nissen, F. Ueber den Nachweis von Toxin im Blut eines an Wundtetanus erkrankten Menschen. Hygienische Rundschau, I. 1891. S. 1018.

Die Ausscheidung des Gifts erfolgt nach Bruchettini¹⁾ durch die Nieren. Die Emulsion der Nierensubstanz von Kaninchen, die an Tetanus zu grunde gegangen waren, erwies sich als stark toxisch. Ebenso fielen Uebertragungsversuche, die mit dem Harn erkrankter Menschen an Mäusen gemacht wurden, positiv aus. Von anderer Seite²⁾ wird dagegen der Urin für ungiftig erklärt.

Um die Angriffsstelle des Gifts zu bestimmen, haben Tizzoni und Vaillard sämtliche Nerven einer Extremität vor der Impfung durchschnitten. Die Extremität blieb schlaff, während die übrige Muskulatur in Starre versetzt wurde. Auf die Muskelsubstanz selbst oder auf die peripheren Nerven wirkt das Gift also nicht. Der Sitz der Wirkung muss vielmehr central sein, worauf auch die spastische Form der Lähmung hinweist.

Zerstört man bei einem an allgemeinem Tetanus leidenden Tier stufenweise das Rückenmark, so schwindet die Starre in den von den zerstörten Teilen früher innervierten Muskeln. Ebenso bleiben nach vorheriger Zerstörung des Lendenmarks bei Einführung einer genügenden Menge Impfmateri als in die hinteren Extremitäten letztere schlaff, während die übrigen Muskeln starr werden.

Diese Experimente, die von Vaillard und Vincent angestellt wurden, lassen auf eine Lokalisation der Giftwirkung im Rückenmark schliessen so, wie es beim Strychnin der Fall ist.

Unverständlich bleibt dabei allerdings der regelmässige Beginn der Starre in den der Impfstelle benachbarten Muskeln, die Beschränkung der Wirkung auf eine Muskelgruppe oder einen einzigen Muskel, die bei Anwendung sehr kleiner Dosen eintritt.

1) Bruchettini, A., Sulla diffusione nell organismo del veneno del tetano. Centralblatt, X, 1891, S. 15.

2) Camara Pestana, de la diffusion du poison du tétanos dans l'organisme. Centralblatt, XI, S. 417.

Wirkung giftfreier Kulturen.

In Reinkultur in den Körper eingeführt fallen die Tetanusbacillen bald der Vernichtung anheim. Im Blut und in den inneren Organen gedeihen sie überhaupt nicht, und an der Impfstelle ist ihre Zahl schon nach verhältnismässig kurzer Zeit verringert. Kitasato konnte sie schon 8—10 Stunden nach der Impfung durch mikroskopische Untersuchung nicht mehr nachweisen. Vaillard und Vincent, die in die vordere Augenkammer eines Meerschweinchens einen Tropfen Tetanusbouillonkultur injicirten und darauf in verschiedenen Zeitabständen etwas von dem humor aqueus entnahmen, fanden in demselben schon nach vier Stunden nur wenig Mikroben, nach sechs Stunden in der Regel gar keine mehr. Es scheint ihnen deshalb wahrscheinlich, dass die Keime sich an der Impfstelle überhaupt nicht vermehren, sondern sich andauernd vermindern und schliesslich ganz verschwinden.

Wenn sich nun die Bakterien mit so wenig Erfolg gegen die ihnen feindlichen Einflüsse des lebenden Organismus zu behaupten vermögen, sollte dann überhaupt, so fragten sich die genannten französischen Forscher, ihr Leben und Thätigsein innerhalb des Körpers als die Ursache der schweren Folgezustände anzusehen sein, die sich nach ihrer Einführung in Reinkultur ausbilden? Macht nicht die ausserordentliche Wirksamkeit des keimfreien Filtrats die Annahme wahrscheinlich, dass bei unsern Experimenten die mit den Mikroben zugleich dem Körper einverleibte Giftmenge, die vorher in den künstlichen Nährsubstraten erzeugt war, allein die Er-

krankung bewirkt, dass dagegen im lebenden Gewebe todbringende Stoffwechselprodukte nicht mehr gebildet werden?

Um diese Frage zu entscheiden, haben Vaillard und Vincent empfänglichen Tieren giftfreie Kulturen eingeimpft. Es zeigte sich, dass sie in verhältnismässig sehr grossen Mengen keine krankmachende Wirkung hatten.

Sie experimentirten zunächst mit Bouillon- und Gelatine-kulturen, die bei 20—22° C. gewachsen und nicht über sechs Tage alt waren. Die Bacillen sollen nämlich bei einer Temperatur von 20—25° C. in den ersten 5—6 Tagen noch kein Gift erzeugen. Meerschweinchen, die bis zu $\frac{1}{3}$ Kubikcentimeter einer solchen angeblich ungiftigen, sehr bacillenreichen, aber sporenfreien Kultur erhielten, boten keinerlei Krankheitserscheinungen dar, nach Injection einer Dosis von $\frac{1}{2}$ Kubikcentimeter zeigte sich nur vorübergehende Starre der Muskeln in der Nähe der Injectionsstelle.

Ebenso sollen alte, sporenhaltige Kulturen relativ unschädlich sein, wenn das Gift durch ein geeignetes Verfahren beseitigt ist.

Von einer Kultur, die nur aus sporentragenden Bacillen bestand, konnte einem Schweinchen ein Kubikcentimeter ohne nachteilige Folgen injicirt werden, wenn das Impfmateriel vorher 20 Minuten auf 65° C. erhitzt war. Das Gift wird sicher durch dieses Verfahren zerstört, die Sporen sollen darunter nicht leiden, wenigstens liefern sie auf frische Nährböden übertragen vollvirulente Kulturen.

Da man aber doch dem Einwand, die Sporen könnten durch die Hitze in ihrer Lebenskraft eine Einbusse erlitten haben, begegnen zu müssen glaubte, wurde noch ein anderes Verfahren angewandt, um das Gift aus den Kulturen zu entfernen. Letztere wurden unter allen Vorsichtsmassregeln gegen Verunreinigungen mit grossen Mengen Wasser, in welchem ja das Gift leicht löslich ist, ausgewaschen. So behandelte Mikroben konnten in enormer Anzahl Tieren ohne

Störung ihres Wohlbefindens beigebracht werden. Der zwölfte Teil des ausgewaschenen Absatzes von 250 Kubikcentimeter Bouillonkultur bewirkte bei einem Meerschweinchen keine Erkrankung; erst der achte Teil erzeugte tödlichen Tetanus. Die benutzte Kultur war 20 Tage alt, sporenreich und so virulent, dass, bevor sie dem Verfahren der Auswaschung unterworfen war, $\frac{1}{400}$ Kubikcentimeter zur Tötung eines Meerschweinchens genügte.

Aus dem Ausfall ihrer Versuche schliessen die französischen Forscher, dass Reinkulturen von Tetanusbacillen in beträchtlicher Menge in gesundes Gewebe eingeführt werden können, ohne den Organismus zu schädigen. Die Bakterien könnten ohne Mitwirkung ihrer giftigen Stoffwechselprodukte im lebenden Tierkörper nicht Fuss fassen und ihre Verderben bringende Thätigkeit ausüben.

Gegen diese Auffassung erhob sich bald Zweifel und Widerspruch. Sanchez-Toledo, der Vaillards Versuche wiederholte, kam zu abweichenden Ergebnissen.¹⁾ Kulturen, die einen Monat alt, sporenreich und stark virulent waren, wurden zugleich mit Filtrat von denselben Kulturen eine Stunde lang auf 70,80 oder 90° C. erhitzt. Während sich das Filtrat völlig wirkungslos erwies, ein Beweis, dass das Gift zerstört war, wurde ein Meerschweinchen von $\frac{1}{2}$ Kubikcentimeter erhitzter Kultur, eine Maus von $\frac{1}{10}$ getötet.

Ausgewaschene Sporen bewirkten in einer Menge, die ungefähr $\frac{1}{50}$ der von Vaillard ohne Erfolg angewandten Dosis betrug, bei Meerschweinchen typischen Tetanus mit tödlichem Ausgang.

Durch die Veröffentlichung dieser Untersuchungen in der *Semaine Médicale* sah Vaillard sich veranlasst, Sanchez-Toledo zur gemeinschaftlichen Wiederholung der Versuche aufzufordern. Der Vorschlag wurde angenommen. Zuerst

1) Sanchez-Toledo, *La Semaine Médicale*, 1891, S. 261, 310.

experimentirte Vaillard mit seinen Kulturen. Die Versuchsergebnisse entsprachen nicht ganz seinen früheren Resultaten. Von dem ausgewaschenen Absatz einer einen Monat alten Bouillonkultur bewirkte die Hälfte der früher als unschädlich befundenen Dosis bei einem Meerschweinchen typischen Tetanus. Geringere Mengen wurden ertragen. Sporenreiche, 14 oder 20 Tage alte Kulturen, die durch Erhitzen giftfrei gemacht waren, erwiesen sich in beträchtlichen Gaben als wirkungslos.

Ebenso fielen die von Sanchez-Toledo mit eigenen Kulturen vorgenommenen Tierversuche negativ aus. Aber seine Kulturen, die nur 14 Tage alt und bei Zimmertemperatur gewachsen waren, enthielten nur sehr wenig Sporen, diese waren zudem wegen ihrer Jugend und der ungünstigen Entwicklungsbedingungen vermutlich wenig widerstandsfähig und wurden durch die Hitze stark geschwächt. Der Ausgang dieser Versuche ist deshalb, so urteilt Sanchez-Toledo, nicht auffallend und bedarf keiner näheren Erklärung, wohl aber spricht die mit ausgewaschenem Absatz erfolgreich vorgenommene Tierimpfung gegen Vaillards Anschauung. Vaillard aber ist der Ansicht, dass bei dem letzteren Versuch das Gift durch das Auswaschen nicht völlig beseitigt worden sei, im übrigen sieht er in dem negativen Ergebnis sämtlicher mit erhitzten Kulturen gemachten Uebertragungsversuche eine Bestätigung seiner früheren Angaben und beharrt auf seinem Standpunkt.

Die Meinungsverschiedenheit der französischen Forscher blieb also bestehen.

Auf Veranlassung des Herrn Professor Karl Fränkel habe ich deshalb ihre Untersuchungen im hygienischen Institut zu Marburg einer Nachprüfung unterzogen.

Ich benutzte zunächst Kulturen, die bei 20—25° C. gezüchtet waren, die also nach Vaillard in den ersten 5 bis 6 Tagen ihrer Entwicklung noch kein Gift enthalten sollen. Ein Kubikcentimeter einer bei 21° C. gewachsenen, 6 Tage

alten, sporenfreien Bouillonkultur wurde einem Meerschweinchen injiziert, das in weniger als 24 Stunden starb.

Sodann wurde von einer bei 23° C. gezüchteten, 5 Tage alten, keine Sporen enthaltenden Bouillonkultur einem Meerschweinchen $\frac{3}{10}$ Kubikcentimeter unter die Haut gespritzt, einer weissen Maus 4 Platinösen unter die Rückenhaut oberhalb der Schwanzwurzel eingebracht.

Das Meerschweinchen ging an Tetanus zu grunde. Die Maus war nach 2 Tagen an der linken hintern Extremität gelähmt, erholte sich aber wieder.

Das Filtrat der Kultur, dessen Wirkung an 2 Mäusen geprüft wurde, bewirkte gleichfalls die Erkrankung.

Aus letzterer Thatsache folgt, dass der von Vaillard ausgesprochene Satz, Kulturen, die bei 20–25° C. gewachsen seien, enthielten anfangs kein Gift, nicht allgemein gültig ist. Möglich, dass in meinem Falle die Bedingungen zur Giftbildung aus irgend einem Grunde besonders günstig waren, dass Vaillard thatsächlich mit giffreien oder fast giffreien Bakterien gearbeitet hat. Indessen gibt er in seiner Arbeit nicht an, dass er die Wirkungslosigkeit des Filtrats durch Tierimpfung festgestellt habe. Deshalb ist diese Art von Versuchen für die Entscheidung der Frage, ob die Bakterien ohne Gift im Tierkörper unwirksam sind, ohne weiteres überhaupt nicht beweiskräftig. Man müsste erst nachweisen, dass die Voraussetzung, nach welcher in den Kulturen kein Gift enthalten sein darf, in dem einzelnen Falle zutrifft. Vaillard scheint aber auf die Giffreiheit der jungen, bei verhältnismässig niedriger Temperatur gezüchteten Bakterien erst aus ihrer relativen Unschädlichkeit geschlossen zu haben. Letztere wurde auch von mir konstatirt. Denn die Maus, die vier Platinösen erlueit, erkrankte zwar, kam aber mit dem Leben davon. Sonst aber wirkt schon eine Platinöse tödlich. Ich machte noch zwei Versuche mit Gelatinekulturen. Bei 21° C.

gewachsen und 5 Tage alt nahmen die Mikroben nur den unteren Teil des Probirröhrchens ein und hatten den Nährboden noch nicht zu verflüssigen angefangen. Nach Zerschneidung des Glases wurde der untere Teil des Gelatine-kuchens, soweit die Bakterienwucherung reichte, in ein steriles Glasschälchen gebracht und im Brutschrank verflüssigt. Die Flüssigkeit enthielt zahlreiche Stäbchen. Eine Maus, die vier Oesen derselben erhielt, blieb gesund.

Bei einem andern Experiment aber, das genau so gemacht wurde, starb die geimpfte Maus am 3. Tag. In dem einen Fall konnte also eine ziemlich grosse Anzahl von Bakterien in den Organismus eingeführt werden, ohne ihn zu schädigen. Das ist nicht wunderbar. Die Zellen waren jung, unter ungünstigen Temperaturverhältnissen gewachsen, und daher nicht kräftig genug, um sich den ihnen feindlichen Einflüssen des lebenden Körpers gegenüber behaupten zu können. In dem anderen Fall war die Widerstandskraft der Bakterien grösser.

Was folgt aus meinen bisherigen Versuchen? Weiter nichts, als dass junge, bei niedriger Temperatur gewachsene Tetanusbacillen durchschnittlich eine geringere Virulenz besitzen, als ältere oder unter besseren Temperaturverhältnissen gezüchtete Bakterien.

Auch Vaillard hätte aus seinen Experimenten nur diesen Schluss ziehen dürfen. Die weitere Folgerung, die er daran geknüpft hat, erscheint willkürlich.

Ausgewaschene Kulturen benutzte ich zu folgenden Versuchen.

Ein Liter einer 20 Tage alten, im Brutschrank gezüchteten Bouillonkultur, die viele Stäbchen und Fäden, etwas weniger Sporen enthielt, wurde in Spitzgläser gefüllt. Ein Teil des nach einigen Tagen gebildeten Absatzes wurde in ein Berkefeld'sches Liliputfilter aus Kieselguhr gebracht und

drei Tage lang durch Aufgiessen sterilen Wassers auswaschen. Im Ganzen wurde etwa $\frac{1}{3}$ Liter Wasser gebraucht. Die Oberfläche des Filterkerzchens war nunmehr mit einem grauen Ueberzug bedeckt. Davon nahm ich etwas ab und schwemmte es in wenig Wasser auf. Ich erhielt so eine Art dünnen Brei, der lediglich aus Mikroben bestand. Eine Maus, die 3 Platinösen unter die Haut erhielt, war am 4. Tage am rechten Hinterbein gelähmt, erholte sich aber später wieder vollständig.

Da wegen der geringen Menge des zum Auswaschen gebrauchten Wassers, die nur $\frac{1}{18}$ des von Vaillard angewandten Quantums betrug, das Gift vermutlich nicht gänzlich beseitigt worden war, wusch ich in einem späteren Versuch den Absatz zweier Spitzgläser derselben Kultur etwas gründlicher aus. Während eines Zeitraums von 6 Tagen liess ich $1\frac{1}{2}$ Liter durch das Filter laufen. Von der Bacillenaufschwemmung, die jetzt schon eher als giftfrei angesehen werden konnte, wurden einer Maus 3 Platinösen beigebracht. Das Tier blieb gesund. Auf frische Gelatine übertragen lieferten die Mikroben eine stark virulente Kultur.

Auch diese Versuche beweisen wenig. Man hat im einzelnen Fall gar keine Sicherheit, dass das Gift völlig beseitigt ist. In dem ersten Versuch war dies vermutlich nicht der Fall. Trotzdem bewirkte eine grosse Anzahl von Bakterien nur eine leichte und vorübergehende Erkrankung. Noch geringer war begreiflicherweise ihr Schädigungsvermögen, nachdem sie gründlicher gewaschen waren. Weshalb nun waren die Keime so ungefährlich? Zum Teil deshalb, weil die Virulenz der benutzten Kultur von vornherein gering war. Denn eine Maus, die zwei Platinösen der nicht gewaschenen Kultur erhielt, war zwar nach zwei Tagen an einem Hinterbein gelähmt, genas aber wieder. Sodann kam die Mithülfe des in vitro erzeugten Gifts, soweit es sich in dem Wasser gelöst und das Filter passiert hatte, in Wegfall. Endlich war

auch das Verfahren der Waschung vielleicht von schädigendem Einfluss auf die Bacillen.

Somit ist es ganz erklärlich, dass ziemlich grosse Mengen ausgewaschener Kultur in meinen beiden Mäuseversuchen nur eine beschränkte, oder gar keine pathogene Thätigkeit entwickelten.

Da durch die bisherigen Versuche die Frage, ob Tetanusbacillen ohne Gift ziemlich ungefährlich für den Organismus sind, aus den angegebenen Gründen nicht entschieden werden konnte, musste ich den Schwerpunkt meiner Untersuchungen in die Tierversuche mit erhitzten Kulturen legen, deren Beweiskraft unbestreitbar ist.

Eine sporenreiche, einen Monat alte Bouillonkultur, von der eine Platinöse zur Tötung einer Maus genügte, wurde eine Stunde lang auf 72 ° C. erhitzt. Es erhielt eine Maus eine Platinöse, eine zweite Maus 2 Oesen. Die erste Maus blieb gesund, die andere starb am dritten Tag an Tetanus. Das zugleich mit der Kultur erhitzte Filtrat wurde in der Dosis von je 0,5 Kubikcentimeter zwei Mäusen eingespritzt. Beide Tiere blieben gesund. Das Gift war also durch die Hitze sicher zerstört worden. Trotzdem hatten die Bacillen in der geringen Menge, die von 2 Platinösen gefasst wird, pathogene Wirkung.

In gleichem Sinne fiel folgender Versuch aus:

Von einer 3 Wochen alten an Sporen sehr reichen Kultur wurden die Keime an kleine Fliespapierstreifen angetrocknet. Eine Maus, der zwei solcher Streifen unter die Rückenhaut gebracht wurden, starb nach 30 Stunden. Eine zweite Maus erhielt einen Streifen, der eine Stunde lang einer Temperatur von 75 ° C. ausgesetzt war. Sie ging nach 98 Stunden an Starrkrampf zu grunde. In diesem Falle war allerdings die Giftfreiheit des Impfmateriails nicht direkt nachgewiesen. Man könnte daher den Einwand machen, die toxische Sub-

stanz sei im trockenen Zustande gegen äussere Einflüsse widerstandsfähiger, als im feuchten.

Auch meine übrigen Versuche lieferten weniger entscheidende Ergebnisse, als der zuerst angeführte.

Eine 6 Wochen alte Kultur, die ziemlich wenig Sporen enthielt und von geringer Virulenz war, so dass 2 Platinösen eine Maus nur vorübergehend krank machten, benutzte ich zu folgenden Experimenten: Ein Reagensröhrchen mit Kultur und ein anderes mit Filtrat wurden zusammen eine Stunde lang im Wasserbade bei 80° C. gelassen. Von der Kultur erhielt dann ein Meerschweinchen $\frac{1}{4}$ Kubikcentimeter, eine Maus 3 Platinösen, von dem erhitzten Filtrat erhielt eine Maus $\frac{1}{2}$ Kubikcentimeter. Alle drei Tiere blieben gesund. Ein Gelatineröhrchen, das mit dem erhitzten Material geimpft wurde, liess nach einer Woche eine üppige Bakterienwucherung erkennen, und ein später mit dieser Kultur vorgenommener Tierversuch bewies ihre volle Virulenz.

Einen Monat später machte ich mit derselben Kultur, die ich zu dem vorhergehenden Experiment benutzt hatte, die jetzt also 10 Wochen alt war, folgende Versuche. Nachdem ich sie eine Stunde lang auf 80° erhitzt hatte, injicirte ich einem Meerschweinchen $\frac{1}{4}$ Kubikcentimeter, einer Maus drei Platinösen. Beide Tiere blieben gesund. Dann liess ich 200 Kubikcentimeter in Spitzgläsern sich absetzen, schwemmte den Absatz in 20 Kubikcentimeter sterilen Wassers auf und erhitze dies Material 1 Stunde auf 90° C. Eine Maus erhielt drei Platinösen, ein Meerschweinchen einen Kubikcentimeter der ausserordentlich sporenenreichen Flüssigkeit. Die Maus erkrankte nicht, das Meerschweinchen starb am dritten Tag. Eine durch Uebertragung von dem erhitzten Absatz auf einen frischen Nährboden erhaltene Kultur erwies sich als vollvirulent; denn geringe Quantitäten derselben bewirkten bei zwei Mäusen tödlichen Tetanus.

Von einer 14 Tage alten, sporenenreichen Bouillonkultur,

die $\frac{3}{4}$ Stunde auf 80° C. erhitzt worden war, erhielt ein Meerschweinchen 0,5 Kubikcentimeter, ein anderes 1 Kubikcentimeter. Keins von beiden Tieren erkrankte. Zwei Mäuse erhielten je $\frac{1}{40}$ Kubikcentimeter. Nur eine Maus wurde krank und starb am 4. Tag, bot aber keine Symptome des Starrkrampfs dar. Von zwei weiteren Mäusen erhielt die eine $\frac{1}{10}$, die andere $\frac{1}{2}$ Kubikcentimeter. Letztere starb am 2. Tag, erstere liess etwa am 6. Tag erst eine deutliche Lähmung einer hinteren Extremität und Starre des in die Höhe gerichteten Schwanzes erkennen. Die Erscheinungen gingen aber zurück, und das Tier genas völlig.

Welche Schlüsse lassen sich aus meinen Versuchen ziehen? Die Tetanusbacillen können nicht als rein toxisch wirkende Bakterien bezeichnet werden. Ihre pathogene Fähigkeit be-thätigt sich vielmehr auch, wenn sie bei ihrer Einführung in den Organismus von giftigen Substanzen völlig frei sind. Sie können also innerhalb des Körpers leben und dort ihre krankmachenden Stoffwechselprodukte absondern.

Freilich ist bei Anwendung giftfreien Materials immer eine gewisse, zuweilen beträchtliche Menge zur Erzeugung der Krankheit erforderlich. Das ist nicht auffallend. Der lebende Tierkörper verfügt über Einrichtungen, die dem Eindringen und der schrankenlosen Vermehrung von Krankheits-erregern hinderlich sind und dem schädigenden Einfluss ihrer Stoffwechselerzeugnisse bis zu einem gewissen Grade zu be-gegen vermögen. Gegen manche pathogene Bakterien sind diese Schutzvorrichtungen allerdings völlig wirkungslos. Zum Zustandekommen der Infektion genügt vielleicht schon eine Zelle, aus der durch Teilung bald eine ungeheure Zahl von Keimen entsteht, die sich über den ganzen Körper verbreiten und im Blut, wie in den Organen überall nachweisbar sind. Man bezeichnet derartige Krankheiten, zu denen zum Bei-spiel der Impfmilzbrand und die Hühnercholera gehören, als septicämische. Im Gegensatz zu ihnen stehn diejenigen In-

fektionskrankheiten, bei denen die Mikroben sich nur an einer Stelle des Körpers entwickeln und von hier aus ihre giftigen Erzeugnisse in die Säfte des Organismus gelangen lassen. Diese Affektionen, zu denen man beispielsweise die experimentell erzeugte Diphtherie und die experimentell erzeugte Cholera rechnen kann, kommen nur dann in schwerer Form zum Ausbruch, wenn dem Körper ein gewisses Quantum von Infektionsstoff einverleibt wird. So ist es auch beim Tetanus. Will man allgemeinen, tödlich verlaufenden Starrkrampf hervorrufen, so darf die Menge des Impfmateri als nicht zu klein sein. Sonst entsteht nur lokaler Spasmus oder gar keine auffällige Krankheitserscheinung. Zeigt sich dies Verhalten schon bei den gewöhnlich benutzten, gifthaltigen Kulturen, so tritt es noch deutlicher bei Anwendung giftfreien Materials hervor. Grosse Mengen desselben sind manchmal wirkungslos. Vaillard gibt an, dass in einem seiner Versuche die tödliche Dosis der giftfreien Kultur mehr als das 100 000fache der gifthaltigen betragen habe. Sanchez-Toledo gelangte mit geringeren Mengen zum Ziel. Auch in meinen positiv ausgefallenen Versuchen waren nicht annähernd so grosse Gaben angewandt worden. Immerhin ertrugen junge Meerschweinchen Dosen von $\frac{1}{4}$ —1 Kubikcentimeter erhitzter Bouillonkultur, ohne wahrnehmbar zu erkranken. Uebrigens erhielt ich bei Benutzung verschiedener Kulturen sehr abweichende Resultate. In einem Versuch genügten zur Tötung einer Maus 2 Platinösen giftfreier Kultur, in einem zweiten ein erhitzter sporenhaltiger Streifen Fliespapier. In andern Fällen waren drei Oesen aufgeschwemmten Absatzes, der sehr viel Keime enthielt, ganz unschädlich. Von einer vierten Kultur endlich bewirkte $\frac{1}{40}$ Kubikcentimeter keine tetanischen Symptome, $\frac{1}{10}$ Kubikcentimeter nur eine lokal bleibende und vorübergehende Starre, $\frac{1}{2}$ Kubikcentimeter rasch tödlich verlaufenden Tetanus. Wie erklären sich diese Differenzen in der Stärke der Wirkung? Weshalb war zu-

weilen die Injektion so grosser Mengen von keinem oder nur unvollständigem Erfolg? Das Fehlen des Gifts in dem Impfmateriel ist selbstverständlich an sich mit einer wesentlichen Verminderung seiner Schädlichkeit gleichbedeutend. Dies Moment kann aber nicht allein entscheidend sein. Denn in zweien meiner Versuche waren trotz vorheriger Zerstörung der toxischen Substanzen relativ geringe Mengen von Sporen für Mäuse tödlich. — Wenn in andern Fällen giftfreie Kulturen bedeutend weniger wirksam waren, so folgt daraus, dass auch auf die Zellen selbst viel ankommt. Nun ist die Virulenz der Tetanusbacillen, wie schon *Kitasato* hervorgehoben hat, sehr schwankend. Die Zusammensetzung des Nährbodens, der Grad der Alkaleszenz, das Alter der benutzten Bouillon, die Wachstumstemperatur, diese und ähnliche Verhältnisse bedingen bei Kulturen gleicher Herkunft oft erhebliche Unterschiede in ihrem Schädigungsvermögen. Thatsächlich war die eine meiner Kulturen von vornherein von geringer Virulenz; denn zwei Platinösen vermochten eine Maus nicht zu töten. Dass nach dem Erhitzen viel grössere Gaben für Mäuse ganz unschädlich waren, ist um so leichter zu verstehn, als bei derselben Kultur die Zahl der Sporen nicht gross war. Enthält eine Kultur viel Stäbchen und wenig Sporen, und werden die ersteren durch die Hitze getötet, so bleiben nur wenig schädliche Keime zurück. Desto grössere Mengen des Materials sind zur Uebertragung der Krankheit erforderlich.

Auch die Resistenz der Sporen gegen hohe Temperaturen darf man nicht zu hoch anschlagen. Man kann annehmen, dass besonders junge, wenig kräftige Sporen unter der Einwirkung der Hitze leiden werden. Verlieren doch die virulentesten Milzbrandbacillen unter dem Einfluss hoher Temperaturen ganz oder teilweise ihren gefährlichen Charakter für den Organismus. Warum soll da nicht das gleiche Schädigungsmittel die Tetanussporen so zu schwächen vermögen, dass der Organismus im Kampf mit ihnen Sieger bleibt, wenn

sie nicht in zu grosser Anzahl in ihn eingedrungen sind? Gegen die Annahme einer Schwächung der Mikroben spricht nicht die Wiederkehr der vollen Virulenz nach Uebertragung auf frische Nährböden. Denn wie Koch an dem Beispiel der Milzbrandbacillen nachgewiesen hat, haftet die Abschwächung, die durch kurzdauernde Einwirkung hoher Temperaturgrade erreicht wird, nicht fest an den Bakterien. Ihre Nachkommen erlangen die frühere Stärke leicht wieder. Bringt man aber die Krankheitserreger nach dem Erhitzen unmittelbar in den lebenden Tierkörper, so wird ihnen die Verminderung ihrer Kraft verhängnisvoll sein. Denn hier haben sie Widerstände zu überwinden, mit denen sie in den toten Nährsubstraten nicht zu kämpfen haben.

So erscheint die schwache Wirkung mancher durch die Hitze giftfrei gemachter Kulturen verständlich. So begreift man auch, warum andere Kulturen sich anders verhalten. Diejenige Kultur, von der ich einer Maus $\frac{1}{10}$ Kubikcentimeter, ohne dass sie starb, injiciren konnte, war nur 14 Tage alt, enthielt also vermutlich Sporen von geringer Widerstandskraft gegen schädliche Einflüsse. Eine andere, die in weit kleinerer Menge tödlich wirkte, war einen Monat alt, sehr virulent und enthielt reichlich Sporen.

Im Gegensatz zu Vaillard und Vincent bin ich also zu der Ansicht gekommen: Reinkulturen von Tetanusbacillen, die man Temperaturgraden, durch welche das Gift sicher zerstört wird, ausgesetzt hat, können doch noch stark schädlich für den Tierkörper sein. In den Fällen, wo sie wenig gefährlich sind, ist daran das Fehlen des Gifts allein nicht schuld, kommen vielmehr noch andere Momente in Betracht. Darin aber pflichte ich den französischen Forschern bei, dass es sich bei den gewöhnlichen Laboratoriumsversuchen wesentlich um eine einfache Intoxikation handelt. Denn die tödliche Dosis

des keimfreien Tetanusgifts ist so gering, dass sie in den angewandten Kulturmengen meist vielfach enthalten sein dürfte.

Anders ist es in der Natur, in der das zur Giftbildung erforderliche eiweissreiche Nährmaterial den Keimen nicht zu gebote steht, so dass sie giftfrei in den Körper gelangen.

Wie kommt die natürliche Infektion zustande? Fast überall in der bebauten Erde, im Staub der Strassen und Wohnungen, im Heustaub, im Stalldünger finden sich die Bacillen. Zur Erhaltung ihres gefährlichen Charakters, der — sollte man meinen — unter dem Einfluss der Luft und des Lichts bald verloren gehn müsse, tragen nach Sormani¹⁾ die pflanzenfressenden Tiere, zum Beispiel Pferde und Kühe, wesentlich bei. Die Fäces dieser Tiere enthalten nämlich sehr häufig das Virus. Sormani glaubt nun, die Keime würden in abgeschwächtem Zustande mit dem durch Staub verunreinigten Futter aufgenommen, vermehrten sich im Darm infolge der dort herrschenden günstigen Lebensbedingungen (alkalische Reaktion, Temperatur), und verliessen vollvirulent den Körper wieder. Durch den Koth würden dann Ställe, Strassen, Wohnungen und Ackerland aufs neue infiziert. Sei dem, wie ihm wolle, jedenfalls sind virulente Keime überall in der Natur, besonders in der Erde vorhanden, und durch Verunreinigung von Wunden mit erdhaltigem Material, die bei der arbeitenden Bevölkerung häufig genug vorkommt, ist reichliche Gelegenheit zur Infektion geboten.

Warum ist thatsächlich der menschliche Wundstarrkrampf eine so seltene Krankheit? Wenn so wenig Mikroorganismen in den Körper gelangen, wie es unter natürlichen Verhältnissen in der Regel der Fall ist, sind — so scheint es — zum Zustandekommen der Affektion noch besondere be-

1) Sormani (Pavia), Ueber Aetiologie, Pathogenese und Prophylaxe des Tetanus. Centrallbl. f. Bacteriologie, Bd. IX, S. 421 und 584.

günstigende Momente notwendig. Die Beschaffenheit derjenigen Stelle des Körpers, an der allein die Bakterien sich aufhalten, ist zunächst ins Auge zu fassen. Wie eine katarhalisch erkrankte Rachenschleimhaut die Ansiedelung und Wucherung der Diphtheriebacillen erleichtert, so werden auch pathologische Veränderungen an der Eintrittsstelle der Tetanusmikroben ihr Gedeihen und ihre Lebensthätigkeit auf Kosten des Organismus befördern. Dafür spricht ein Experiment Vaillards, der Tieren in eine Extremität, die er vorher tüchtig mit der Pincette gequetscht hatte, geringe Quantitäten giffreier Kultur mit Erfolg injicirte, während viel grössere Mengen desselben Impfmateri als bei Kontrolltieren unwirksam waren. Auch die spontanen Erkrankungen schliessen sich häufig an stärkere Verletzungen oder sonstige Affektionen an, die mit einer örtlichen Cirkulationsstörung einhergehen und dadurch den Bacillen einen günstigen Angriffspunkt bieten. So werden viele Fälle berichtet, die im Gefolge einer Verbrennung, einer Gangrän, oder einer komplizirten Fraktur auftraten.

Noch ein anderer Umstand ist vielleicht für die Entstehung des Wundstarrkrampfs von Wichtigkeit. Während nach Uebertragung von Reinkulturen die gemachten Wunden reaktionslos heilen, beobachtet man in Fällen spontaner Erkrankung eine Eiterung oder wenigstens eine ausgesprochene Entzündung an der Infectionsstelle und findet hier regelmässig neben den Tetanusbacillen noch Eitercoccen und andere Microorganismen. Sollten letztere nicht, obwohl für sich allein ziemlich harmloser Natur, doch durch die Folgen ihres Aufenthalts im Körper die Thätigkeit der Tetanuserreger in ähnlicher Weise unterstützen, wie dies für andere Infectionskrankheiten nachgewiesen ist? In der That fand Vaillard, dass Tetanuskulturen, denen er *Prodigiosus* bacillen beigemischt hatte, in viel geringerer Menge wirkten, als ohne jenen Zusatz. Ich selbst konnte konstatiren, dass erhitzte Kultur,

die für sich in der Gabe von einem Kubikcentimeter für ein Meerschweinchen unschädlich war, in der Hälfte dieser Dosis den Tod bewirkte, wenn ich zugleich $\frac{1}{2}$ Kubikcentimeter einer 20 Tage alten Prodigiosuskultur injizierte.

Man kann also annehmen, dass natürliche Verunreinigung einer Wunde mit Tetanusvirus nicht stets zu einer Erkrankung führen wird, dass noch besondere für das Bakterienwachstum förderliche Momente hinzukommen müssen, über die wir noch nicht genau unterrichtet sind.

Herrn Prof. Karl Fränkel sage ich für die Freundlichkeit, mit der er mich bei meiner Arbeit unterstützt hat, herzlichen Dank.

Lebenslauf.

Geboren wurde ich am 11. Januar 1866 in Vöhl, einem Flecken der Provinz Hessen-Nassau, als der Sohn des Gemeindevorstandes Karl Klipstein und seiner Ehefrau Auguste, geb. Cranz. Ich gehöre der lutherischen Confession an.

Von meinem 6. bis zu meinem 12. Lebensjahre besuchte ich die Elementarschule meines Heimatorts. Dann kam ich auf das Gymnasium zu Korbach in Waldeck, das ich Herbst 1885 mit dem Zeugnis der Reife verliess. Ich liess mich hierauf an der Universität in Marburg immatrikuliren, um Medizin zu studiren. Am Schluss meines vierten Studien-Semesters bestand ich das tentamen physikum. — Ostern 1888 bezog ich die Münchener Universität, der ich zwei Halbjahre angehörte. Im Sommer-Semester 1889 nach Marburg zurückgekehrt studirte ich hier noch vier Semester und meldete mich dann zur Staatsprüfung, die ich am 28. Dezember 1891 beendete. Zwei Tage später bestand ich das mündliche Doktorexamen.

Meine akademischen Lehrer waren:

1. in Marburg: die Herren

Prof. Dr. *Wagener*,

„ *E. Schmidt*,

„ *Dr. Wigand*,

„ „ *Zincke*,

„ „ *Lieberkühn*,

„ „ *Greeff*,

„ „ *Külz*,

„ „ *Kohl*,

„ „ *Strahl*,

„ „ *Melde*,

„ „ *Marchand*,

„ „ *Roser*,

„ „ *r. Heusinger*,

Prof. Dr. *Alfeld*,

„ „ *Mannkopff*.

„ „ *H. Meyer*,

„ „ *H. Braun*,

„ „ *Küster*,

„ „ *Schmidt-Rimpler*,

„ „ *Rumpf*,

„ „ *Rubner*,

„ „ *Lahs*,

„ „ *Uhthoff*,

„ „ *Barth*,

„ „ *Tuczek*.

2. in München:

die Herren Professoren: *Bauer*, *Winckel*, *Tappeiner*, *Posselt*,
Ziemssen, *Amann*, die Herren Doktoren: *Herzog*, *Stintzing*,
Messerer.

Marburg, den 22. Oktober 1892.

Ernst Klipstein.

11047