



Det här verket har digitaliserats vid Göteborgs universitetsbibliotek och är fritt att använda. Alla tryckta texter är OCR-tolkade till maskinläsbar text. Det betyder att du kan söka och kopiera texten från dokumentet. Vissa äldre dokument med dåligt tryck kan vara svåra att OCR-tolka korrekt vilket medför att den OCR-tolkade texten kan innehålla fel och därför bör man visuellt jämföra med verkets bilder för att avgöra vad som är riktigt.

This work has been digitized at Gothenburg University Library and is free to use. All printed texts have been OCR-processed and converted to machine readable text. This means that you can search and copy text from the document. Some early printed books are hard to OCR-process correctly and the text may contain errors, so one should always visually compare it with the images to determine what is correct.



KUNGL. LANTBRUKSSTYRELSEN.

Meddelanden från Statens undersöknings- och försöksanstalt för sötvattensfisket. Nr 8.
(Mitteilungen der Anstalt für Binnenfischerei bei Drottningholm, Stockholm.)

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN BEI FISCHEN
KRANKHEITSERREGENDEN SPALTPILZ
VIBRIO ANGUILLARUM

VON

ORVAR NYBELIN

Mit 2 Tabellen und 2 graph. Figuren

Svensk resumé

STOCKHOLM
TRYCKERIAKTIEBOLAGET TIDEN
1935

FÖRTECKNING ÖVER KUNGL. LANTBRUKSSTYRELSENS FISKERIPUBLIKATIONER.

(Meddelanden från Kungl. Lantbruksstyrelsen.)

1891. *Alexander Krüger*. Berättelse till Kgl. Lantbruksstyrelsen för åren 1889—1890 från fiskeriagenturen i Berlin. Nr 4.
- *) 1893. *Filip Trybom*. Ringsjön i Malmöhus län dess naturförhållanden och fiske. Nr 13.
1895. *Filip Trybom*. Lyngern jämte Sundsjön, Stensjön och St. Svansjön i Älvsborgs och Hallands län. Nr 20. Pris kr. 0:30.
1895. *Filip Trybom*. Sjöarna Noen och Valen i Jönköpings län. Nr 26.
- *) 1896. *Filip Trybom*. Sjön Bunn i Jönköpings län. Nr 31.
1897. *Filip Trybom*. Berättelse om en för fiskeristudier till Tyskland och Österrike sommaren 1896 företagen resa. Nr 40. Pris kr. 0:30.
- *) 1898. *Einar Lönnberg*. Undersökningar rörande Öresunds djurliv. Nr 43. Pris kr. 0:50.
1899. *Einar Lönnberg*. Fortsatta undersökningar rörande Öresunds djurliv. Nr 49. Pris kr. 0:25.
- *) 1899. *Filip Trybom*. Sjön Nömmen i Jönköpings län. Nr 50. Pris kr. 0:50.
- *) 1899. *Rudolf Lundberg* Om svenska insjöfiskarnas utbredning Nr 58. Pris kr. 1:—.
1900. *Einar Lönnberg*. Om de kaspiska fiskerierna. Nr 61. Pris kr. 0:50.
1901. *Filip Trybom*. Bexhedasjön, Norrasjön och Näsbyssjön i Jönköpings län. Nr 76. Pris kr. 0:50.
1902. *Einar Lönnberg*. Undersökningar rörande Skeldervikens och angränsande Kattgatt-områdes djurliv. Nr 80. Pris kr. 0:50.
1904. *Alf Wollébæk*. Om Mörrums- och Ätraåarnas laxfiske. Nr 94. Pris kr. 0:20.
1905. *Thorsten Ekman*. Undersökningar över flodpärlmusslans förekomst och levnadsförhållanden i Ljusnan och dess tillflöden inom Härjedalen. Nr 110. Pris kr. 0:20.
1906. *Carl Schmidt*. Studier över fiskvägar m. m. Reseberättelse. Nr 119. Pris kr. 0:75.
1907. *O. Nordqvist*. Undersökning av krafter från sjön Rottnen. Nr 128. Pris kr. 0:25.
1908. *Thorsten Ekman*. Vassbuksfisket i Finland och Estland. Reseberättelse. Nr 136. Pris kr. 0:25.
1910. *Carl Schmidt*. Studier över fiskvägar, fiskodlingsanstalter m. m. Reseberättelse. Nr 150. Pris kr. 0:50.
1910. *Filip Trybom*. Undersökningar rörande svenska laxförande vattendrag. I. Viskan. Nr 156. Pris kr. 1:—.
1910. *Thorsten Ekman* och *Carl Schmidt*. Undersökningar rörande svenska laxförande vattendrag. II. Motala Ström. Nr 157. Pris kr. 0:30.

*) Upplagan slut.

KUNGL. LANTBRUKSSTYRELSEN.

Meddelanden från Statens undersöknings- och försöksanstalt för sötvattensfisket. Nr 8.
(Mitteilungen der Anstalt für Binnenfischerei bei Drottningholm, Stockholm.)

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN BEI FISCHEN
KRANKHEITSERREGENDEN SPALTPILZ
VIBRIO ANGUILLARUM

VON

ORVAR NYBELIN

Mit 2 Tabellen und 2 graph. Figuren

Svensk resumé

STOCKHOLM
TRYCKERIAKTIEBOLAGET TIDEN
1935

Inhaltsübersicht.

	Seite
Vorwort	3
Einleitung	5
I. Bakteriologische Untersuchung der gefundenen Vibrionen.	
1. Materialgewinnung	8
2. Morphologisches	9
3. Beziehungen zu verschiedenen Kulturmedien	10
4. Pathogenität	20
5. Agglutinationsversuche	23
6. Zusammenfassung; Systematisches	25
II. Beziehungen von <i>Vibrio anguillarum</i> zum Wirt.	
1. Krankheitserscheinungen	28
2. Zur Kenntnis der natürlichen Abwehrmittel der Fische gegen Bakterien	30
III. Allgemeine Schlussfolgerungen.	
1. In welcher Ausdehnung ist die Agglutinationsmethode als dia- gnostisches Hilfsmittel verwendbar?	51
2. Ist mit einer erworbenen Immunität bei Fischen nach überstan- dener Infektion zu rechnen?	53
3. Ist eine Schutzimpfung gegen Bakterieninfektionen bei Fischen denkbar oder möglich?	57
Svensk resumé	59
Schriftenverzeichnis	62

Die erste Anregung zu den vorliegenden Studien gab die Untersuchung eines am 16. IX. 1930 ausserhalb Gräsgård an der Ostküste Ölands gefangenen Aals, der wegen des stark aufgetriebenen Bauches (man vermutete, dass es sich um ein laichreifes Weibchen handle) dem Fischereibureau des K. Landwirtschaftsministeriums eingesandt wurde. Als ich zu dieser Zeit mit bakteriologischen Untersuchungen an pestkranken Krebsen im Bakt. Laboratorium des Städt. Gesundheitsamtes zu Göteborg arbeitete, bot sich mir eine willkommene Gelegenheit, den kranken Aal auch bakteriologisch zu untersuchen, da er ausser dem genannten Merkmal auch solche der "Rotseuche" aufwies. Diese erste, zu rein diagnostischem Zweck vorgenommene Untersuchung lockte, dank der vorzüglichen Arbeitsmöglichkeiten in Göteborg, zu erweiterten Untersuchungen, die u. a. über Impfversuche an gesunden Aalen, um die Pathogenität der gefundenen Bakterien zu prüfen, auf die wenig erforschten Fragen der Antikörperbildung bei Fischen hinüberleiteten. Weitere Untersuchungen hierüber, ebenfalls im Laboratorium zu Göteborg ausgeführt, wurden durch geldliche Unterstützung aus "Elisabeth och K. G. Lennanders fond för naturvetenskaplig och medicinsk forskning" ermöglicht. Endlich sind ergänzende Versuche im Laboratorium der Untersuchungs- und Versuchsanstalt für Binnenfischerei in Drottningholm ausgeführt worden; erst in diesem für experimentelle Fischuntersuchungen vortrefflich eingerichteten Speziallaboratorium konnten die wichtigen Fragen über den Einfluss verschiedener Temperatur bei der Antikörperbildung in Angriff genommen werden.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Vorstand des Bakt. Laboratoriums zu Göteborg, Herrn Dr. A. Wassén, für die wertvolle Hilfe und das rege Interesse, womit er meine Untersuchungen stets unterstützte und verfolgte, auch hier meinen besten Dank auszusprechen. Den Assistenten des Laboratoriums schulde ich ebenfalls in vieler Hinsicht grossen Dank. Auch möchte ich meinem Kollegen, Herrn Privatdozent Dr. W. Schäperclaus, Berlin-Friedrichshagen, sowie Herrn Dr. B. Heiberg, Kopenhagen, für das lebenswürdige Übersenden von Bakterienstämmen als Vergleichsmaterial meinen besten Dank sagen. Schliesslich will ich auch meinem Freunde, Dr. Phil. E. Furreg, Wien, für die sprachliche Durchsicht des Manuskriptes aufs herzlichste danken.

Vibrio anguillarum wurde zuerst von *Bergman* (1909) beschrieben; er fand ihn in kranken Aalen aus dem Sund bei Limhamn im Jahre 1907 und benannte die Krankheit nach ihrem auffallendsten Merkmal "rote Beulenkrankheit". Seitdem sind ähnliche Vibrionen zu wiederholten Malen in kranken Fischen der nordeuropäischen Küstengewässer (Ostsee, Kattegatt, Skagerak) gefunden worden, zuerst von *Bergman* (1911) selbst, der sie in einem Falle bei einer als infektiöse Keratomalacie bezeichneten Augenkrankheit beim Dorsche an der Südküste Schonens zwischen Ystad und Trälleborg fand, in einem anderen Falle aus einem an der Küste der Provinz Södermanland gefangenen Hechte mit Zahnfleischentzündung reinzüchtete. Als Ursache der grossen Aal- bzw. Hechtsterben (es wurden auch Barsche und Bleie befallen) bei Rügen und Stralsund in den Jahren 1925—26 bzw. 1925—27 fand *Schäperclaus* (1927, 1928) ebenfalls Vibrionen, die er als mit *V. anguillarum* identisch betrachtete und von welchen er neuerdings (1934) weitere Ergebnisse aus dem in den Jahren 1931—32 an der deutschen Ostseeküste beobachteten Aalsterben mitgeteilt hat; in dieser letzterwähnten Arbeit wird auch über das interessante Vorkommen von *V. anguillarum* in Plötzen der Saale bei Gr.-Rosenburg und Bernburg berichtet, wo das Saale-Wasser einen "Mindestgehalt von etwa 450 mg/l Cl (berechnet für NaCl)" aufweist. Endlich haben *Braun* und *Heiberg* (1932) von einer im Jahre 1931 auftretenden Krankheit der Aale einiger dänischer Küstengewässer (Sund, Südküste von Sjælland u. s. w.) berichtet, die ebenfalls von einem *Vibrio*, von ihnen als *Vibrio anguillicida* n. sp. bezeichnet, verursacht wurde.

Die von mir selbst beobachteten Krankheitsfälle, wo *Vibrio anguillarum*-ähnliche Vibrionen gefunden wurden, beschränken sich auf die folgenden:

- 1) Im Oktober bis November 1924 erhielt ich mehrere in Gäsö Ränna unweit der Zoolog. Station Kristineberg, Provinz Bohuslän, gefangene Dorsche, deren Augen mehr oder weniger stark angegriffen waren, und zwar in ähnlicher Weise wie es *Bergman* für die infektiöse Keratomalacie beschrieb. Da ich an der Stat. Kristineberg keine Möglichkeit hatte, eine bakteriologische Untersuchung vorzunehmen, wurde das Material der Staatl.

Veterinärbakteriolog. Anstalt in Stockholm eingesandt, woher mitgeteilt wurde, dass im Auge einer der vier eingelangten Dorsche eine gelatineverflüssigende, mit *Bergmans* Dorschvibrionen vielleicht identische *Vibrio*-Form gefunden wurde, und dass in zwei der übrigen Fälle die Veränderungen der Augen mit den von *Bergman* bei der Keratomalacie beschriebenen übereinstimmten. Die Vibrionen wurden nicht näher untersucht, auch nicht aufbewahrt, es scheint mir aber alle Wahrscheinlichkeit dafür zu sprechen, dass wir es hier mit einem weiteren Fall von der von *Bergman* aus Ostseedorchen beschriebenen Keratomalacie zu tun hatten. In den darauffolgenden Jahren wurden keine weiteren derartig erkrankten Dorsche beobachtet.

2) Der zweite Fall bezieht sich auf den schon in der Einleitung erwähnten, auch weiter unten näher zu besprechenden Aal, der am 16. Sept. 1930 bei Gräsgård an der Ostküste Ölands in einem Aalbodengarn gefangen wurde; auf Anfrage wurde gemeldet, dass keine weiteren kranken Aale hier gesehen oder gefangen wurden.

3) Als ich Ende April 1931 eine Reise nach Limhamn vornahm, um zu versuchen, an *Bergmans* ursprünglichem Fundort kranke Aale zu erhalten, hatte ich das Glück, einen der Brüder Kristensson, die 25 Jahre früher *Bergman* mit Material versorgt hatten, zu sprechen; er teilte mit, dass beulenranke Aale fast jedes Jahr in den Monaten April—Mai hier gefangen wurden und bestätigte *Bergmans* Angabe, dass vorzugsweise grössere Aale angegriffen werden. Auch in diesem Jahre (1931) hatte man recht viele kranke Aale erbeutet. Er versprach, mir bei Gelegenheit kranke Aale zu schicken; da aber kein Material eintraf, wurde auf eine Anfrage geantwortet, dass man zwar nach meinem Besuche einige kranke Aale gefangen hatte, diese aber wegen fortgeschrittener Krankheit so hässlich aussahen, dass man sie nicht hatte einsenden wollen! Im Jahre 1932 wurden keine beulenkranken Aale erbeutet, nach Angabe darauf beruhend, dass in diesem Jahre fast nur kleine Aale gefangen wurden. Im Jahre 1933 erhielt ich am 20. April zwei bei Limhamn gefangene, tote Aale mit Rötungen am Bauche, aber ohne Beulen; die Abimpfungen aus Herz- und Nierenblut fielen negativ aus. Trotzdem ich also kein *Vibrio*-Material aus dieser Gegend erhalten habe, ist wohl aus den oben angeführten Angaben zu schliessen, dass im Sund bei Limhamn ein konstanter Seuchenherd der *Vibrio anguillarum*-Krankheit besteht.

4) Im Herbst 1931 wurde aus Göteborgs grosser Aquarienanlage ein kranker Steinbutt an das Bakt. Laboratorium in Göteborg eingeliefert; da ich zu dieser Zeit im Laboratorium nicht arbeitete, wurde der Fisch vom Assistenten Dr. *T. Olsson* untersucht. Aus der Aszitesflüssigkeit sowie aus der Milz wurden Vibrionen reingezüchtet, die mir später zur Untersuchung

freundlichst überlassen wurden und die weiter unten näher besprochen werden. Auf Anfrage wurde berichtet, dass in den grossen Meerwasserbehältern des Aquariums fast alljährlich im Spätsommer, also zur Zeit, wo das Wasser die höchste Temperatur aufweist, ein oft beträchtlicher Teil der Fische erkrankt und eingeht. Es können die verschiedenartigsten Fische befallen werden, vor allem verschiedene Dorsch- (Gadiden) und Flunderfische (Pleuronectiden), aber auch andere, wie Arten der Gattungen *Trigla*, *Labrus* u. s. w. Die Krankheitsmerkmale sind für gewöhnlich Rötungen der Haut und der Flossen, welche letztere aufgefasert werden, doch kommt auch Erblindung vor.

5 und 6) In zwei unten näher zu besprechenden Fällen habe ich bei Aalen, die angeblich in der Nähe von Göteborg bzw. Stockholm gefangen wurden, durch serologische Prüfung feststellen können, dass die betreffenden Aale Infektion mit *V. anguillarum* überstanden haben müssen.

Ausser diesen Gelegenheiten, bei welchen *Vibrio anguillarum* oder jedenfalls ähnliche Vibrionen beobachtet wurden, kennen wir deren mehrere, wo Aalsterben von grösserem Umfange vorkam, ohne dass dabei eine bakteriologische Untersuchung ausgeführt wurde, und man folglich nur vermutungsweise sagen kann, dass die Erreger dem *Vibrio anguillarum*-Typus angehörten. Hieher gehören z. B. die von *Feddersen* in den Jahren 1896—97 an den dänischen Küsten sowie die von *Klüss* im Jahre 1898 bei Wismar beobachteten Rotseuchen.

Von ähnlichen Seuchen im Limfjord, Dänemark, in den Jahren 1905 und 1906, wo ausser Aalen auch Schollen in grosser Ausdehnung angegriffen wurden, wird bei *Bruun* und *Heiberg* (1932 p. 11) berichtet, und in der schwedischen Fischereizeitung, "Ny Svensk Fiskeritidskrift" für das Jahr 1932 (p. 202) ist ein Aalsterben an der schwedischen Westküste im Herbst 1932 erwähnt. Es ist zu bedauern, dass von diesen schwedischen Krankheitsfällen kein Material an Sachverständige übersandt wurde; die in der Notiz gegebene Diagnose Salzwasseraalrotseuche ist also, obwohl wahrscheinlich richtig, nicht bakteriologisch begründet. Nach brieflichen Mitteilungen meines Freundes Dr. *Paul Bjerkan*, Bergen, war im Jahre 1933 der Aalbestand an der norwegischen Skagerakküste sowie im Oslofjord von "Rotseuche" sehr stark angegriffen; auch in diesem Falle wurde keine bakteriologische Untersuchung vorgenommen. Endlich vermute ich, dass die in den Tageszeitungen erwähnte Krankheit der Schollen, die im Jahre 1934 an der dänischen Westküste beobachtet wurde, und die sich hauptsächlich in roten, zerfetzten Flossen äussern soll, auch auf eine Vibrioninfektion zurückzuführen ist.

Es liegen somit eine ganze Reihe von Beobachtungen über kranke Fische aus deutschen, dänischen, norwegischen und schwedischen Küstengewässern vor, wo teils *Vibrio anguillarum*, teils mit diesem sehr nahe verwandte, wahrscheinlich aber doch identische Vibrionen gefunden wurden. Am häufigsten handelt es sich um Aalsterben, aber auch bei Hechten und Dorschen sind Masenerkrankungen beobachtet worden; ausserdem sind mehrere andere unserer Küstenfische als für diese Vibrionen empfänglich erkannt worden, und den Symptomen nach schliessen sich diesen Fällen noch mehrere an, wo eine bakteriologische Untersuchung nicht vorgenommen wurde. Andererseits ist meines Wissens keine ansteckende Krankheit bei unseren Küstenfischen bekannt, wo andere Spaltpilze als Vibrionen gefunden wurden. Schon hieraus ist die hervorragende Bedeutung dieser fischpathogenen Vibrionen zu ersehen. Und da hierzu noch die Tatsache kommt, dass durch die von ihnen hervorgerufenen Seuchen Schäden von grosser wirtschaftlich-ökonomischer Bedeutung verursacht werden können, ist ohne weiteres einzusehen, dass jeder Beitrag zur Vervollkommnung unserer Kenntnis dieser Krankheitserreger und der von ihnen hervorgerufenen Krankheiten von Wert sein kann. Ich halte es deshalb nicht für unangemessen, meine Beobachtungen über diesen Spaltpilz zu veröffentlichen, trotzdem er schon mehrmals Gegenstand zum Teil recht eingehender Untersuchungen war.

I. Bakteriologische Untersuchung der gefundenen Vibrionen.

1. Materialgewinnung.

Das erste und wichtigste Material für die vorliegende Untersuchung wurde, wie gesagt, von dem oben unter Punkt 2 erwähnten Aal geliefert. Er war bei der Ankunft noch am Leben, starb aber innerhalb einer Stunde.

Die äusseren Krankheitsmerkmale waren: Stark aufgetriebener Bauch, recht kräftige Hautrötungen der Körperseiten bis zum After, der etwas vorgestülpt und von einer ringförmigen Hautrötung umgeben war. Es wurden sofort Kulturen mit in üblicher Weise entnommenem Blut aus den Schwanzgefässen auf Endo- und Aszitesagarplatten, sowie in steriler Bouillon angelegt, worauf die Bauchhöhle steril geöffnet wurde. Magen stark erweitert, mit mattem Belag, Leber etwas rötlich, sonst keine krankhaften Veränderungen bemerkbar; keine Aszitesflüssigkeit. Die Magenwand wurde (ohne vorherige Sterilisierung!) mit steriler Pasteur-Pipette durchstochen und mit der derart gewonnenen Probe des schleimig-flüssigen Mageninhaltes wurden ebenfalls Kulturen auf Endo- und Aszitesagarplatten, sowie in ste-

riler Bouillon gemacht. Endlich wurde ein Bouillonröhrchen mit steril entnommenem Herzblut geimpft.

Auf allen Platten mit Schwanz- bzw. Herzblut wuchsen, von wenigen Luftverunreinigungen (Kokken) einiger Platten abgesehen, nur untereinander gleichartige Kolonien hervor, auf den mit Mageninhalt bestrichenen Platten waren aber, neben vereinzelt Kokken, Kolonien von, dem Aussehen nach beurteilt, dreierlei Art vorhanden. Es wurden Schrägagarkulturen angelegt, teils aus einer Kolonie der Aszitesplatte mit Schwanzblut (Bezeichnung Aal I), teils aus je einer der drei Kolonietypen der Endo-Platte mit Mageninhalt (Aal II, Aal III und Aal IV), teils aus einer Kolonie der Endo-Platte mit Schwanzblut (Aal V). Aal II bestand aus unbeweglichen kokkoiden Stäbchen, die Gelatine nicht verflüssigten, Aal III aus kurzen beweglichen, gelatineverflüssigenden Stäbchen, die sich ausserdem u. a. durch starke H_2S -Bildung und Reduktion der Lackmusfarbe auszeichneten; diese beiden Stämme, die also mit *Vibrio anguillarum* nichts zu tun hatten, werden im folgenden nicht weiter erwähnt. Die drei übrigen Stämme waren Vibrionen und wurden, um ihre eventuelle Identität mit *V. anguillarum* festzustellen, näher untersucht. Als Vergleichsmaterial stellte mir Dr. Schüperclaus zwei *Vibrio anguillarum*-Stämme gütigst zur Verfügung, die von ihm aus einem Hecht bei Rügen 1927 und einer Plötze aus der Saale 1930 isoliert wurden (seine Stämme aus kranken Aalen waren leider eingegangen); diese Stämme waren als I bzw. XVII bezeichnet und werden im folgenden als Sch I bzw. Sch XVII angeführt. Endlich sind in der Untersuchung auch die oben unter Punkt 4 erwähnten, vom Assistenten Olsson aus einem Steinbutt reingezüchteten und mir gütigst überlassenen *Vibrio*-Stämme, hier als P I und P II bezeichnet, mit einbezogen. Die folgende Zusammenstellung der Ergebnisse der diagnostischen Untersuchung bezieht sich, soweit nicht anderes bemerkt wird, auf sämtliche hier erwähnten *Vibrio*-Stämme.

Als die Untersuchung in ihren Hauptzügen schon längst abgeschlossen war, erhielt ich von Dr. Schüperclaus vier Stämme, nr 6, 10, 16 und 24 von dem bei Stralsund im Jahre 1931 eingesammelten Material, hier als Sch 6, 10, 16 und 24 bezeichnet und von Dr. Heiberg zwei Stämme von *V. anguillida*, hier als H I und H II angeführt. Sie konnten in diese Untersuchung nur zum Teil einbezogen werden.

2. Morphologisches.

Sämtliche Stämme meines Materials, also Aal I, Aal IV, Aal V, P I und P II sind, wie gesagt, als Vibrionen zu bezeichnen, indem sie in der Regel eine kommaförmige Gestalt aufweisen, die besonders in den S- oder 3-

förmigen Teilungsstadien deutlich zum Ausdruck kommt; meistens ist die Krümmung weniger ausgeprägt, und in älteren Kulturen kommen häufig Involutionsformen vor, wie sie von *Bergman* (1909) und *Schäperclaus* (1927, 1928) beschrieben wurden. Sie sind Gram-negativ und bilden keine Kapseln. Sporenbildung konnte niemals, auch nicht in alten, austrocknenden Schrägagarkulturen, konstatiert werden. Stiehkulturen in halbflüssigem (0,35 %) Agar zeigten, dass sie lebhaft beweglich waren.

3. Beziehungen zu verschiedenen Kulturmedien.

Kolonien. Auf Aszitesagarplatten (Aal I) sowie auf gewöhnlichen Agarplatten runde, ursprünglich wasserklare, später gelblichgraue Kolonien von wenig charakteristischem Aussehen. Auf Endo-Agarplatten (Aal V) bei Zimmertemperatur nach 24 Stunden ebenfalls kleine runde, wasserklare Kolonien, nach 48 Stunden grösser, tiefrot mit wasserklarem Rande, nach 7—8 Tagen etwa 6—10 mm im Durchmesser betragende, lackrote, wenig erhabene Kolonien.

Auf gewöhnlicher Gelatine bildeten die Stämme Aal I und Aal V nach 48 Stunden schalenförmige, kreisrunde Kolonien von 1,5—2 mm Durchmesser mit einem graulichen, in der Mitte gelblichen, flockigen Bodensediment. Nach drei Tagen haben die Kolonien etwa 5—10 mm, nach 4 Tagen etwa 14—18 mm Durchmesser. Wie von *Bergman* (1909) hervorgehoben wird, riechen die Gelatineplatten nach Leim, sobald die Peptonisierung der Gelatine begonnen hat.

Strichkulturen auf schräger Gelatine, wie sie von *Bergman* (1909) beschrieben wurden, mit den Stämmen Aal I, Aal IV und Aal V angelegt, wiesen schon nach 48 Stunden die charakteristische Dreiteilung des Substrats auf.

Die *Gelatinestiehkulturen* sind als choleraähnlich zu bezeichnen. Auf die kleinen, unwesentlichen Variationen, die die verschiedenen Kulturen aufwiesen, braucht hier nicht näher eingegangen zu werden, ich begnüge mich deshalb mit der Bemerkung, dass die Stämme Aal I, Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII sehr mit der von *Schäperclaus* (1927) gegebenen Beschreibung übereinstimmten, nur dass noch nach 30 Tagen eine Trübung der obersten 10 mm der Flüssigkeit unmittelbar unter dem noch vorhandenen Häutchen zu beobachten war, während die Stämme P I und P II die Gelatine schneller verflüssigten, etwa wie es *Schäperclaus* später (1928) beschrieb. Bemerkenswert ist nur, dass der Stamm Sch I, der 1927 zu dem schnell verflüssigenden Typus gehörte, in meinen Versuchen drei Jahre

später die langsamste Verflüssigung aufwies, was wohl darauf hindeutet, dass diese Fähigkeit nach langer Züchtung herabgesetzt werden kann.

Auf *schrägem Agar* wiesen die Kulturen Aal I, Aal V, P I, P II, Sch I und Sch XVII einen wenig charakteristischen Wuchs auf und das Substrat wurde, mit Ausnahme von feinen, von der Oberfläche her eindringenden Kristallnadeln, nicht merklich verändert. Anders verhielt sich aber der Stamm Aal IV, der etwa nach 8 Tagen eine braune Farbe zeigte, die auch den Agar stark bräunlich färbte; in mit Paraffin verschlossenen Schrägagarkulturen trat indessen diese Braunfärbung nicht auf. Eine derartige Verfärbung des Substrats wird von *Bergman* für *V. anguillarum* nicht erwähnt, von *Schäperclaus* wird nur 1928 angegeben, dass sich der Agar bei älteren Plattenkulturen "durch einen aus der Kolonie herausdiffundierenden Farbstoff leicht bräunlich" färbte. Auf dieses Merkmal hin den Stamm Aal IV als eine neue Art auszusecheiden, halte ich natürlich für ganz verfehlt und dies umsomehr, als er, wie wir weiter unten sehen werden; in agglutinatorischer Hinsicht mit den Stämmen P I und P II völlig identisch war, welche letzteren aber keine Braunfärbung des Substrats bewirken.

Auf *Kartoffeln* zeigten Aal I, Aal V, P I, P II, Sch I und Sch XVII nach drei Tagen eine rein gelbe Farbe, die in 6 Tage alten Kulturen in eine dunklere, honiggelbe Farbe übergegangen war und die sich in älteren Kulturen noch etwas mehr verdunkelte, ähnlich wie es *Bergman* und *Schäperclaus* beschreiben. Meistens war aber der Belag ausserdem weiss umrandet. Auch in diesem Falle verhielt sich jedoch Aal IV den übrigen Stämmen gegenüber verschieden; nach 6 Tagen zeigte der dunkelgelbe Belag einen Stich ins Graugrün und vom 9. Tage an wurde das Substrat immer dunkler verfärbt, bis es nach 24 Tagen, einmal schon nach 13 Tagen, fast ganz schwarz wurde. Dass wir es in diesem Falle mit der gleichen Farbstoffbildung zu tun haben, die in den entsprechenden Schrägagarkulturen eben besprochen wurde, ist wohl anzunehmen, und muss wohl auch in systematischer Hinsicht als ebenso bedeutungslos angesehen werden.

In *Bouillonkulturen* von *V. anguillarum* fand *Bergman* nur gleichmässige und mehrere Wochen lang bestehende Trübung schon nach 12 Stunden, einen feinen Bodensatz bereits nach 24 Stunden und nach 3—10 Tagen eine zarte Haut an der Oberfläche. Nach *Schäperclaus* (1928) weisen die Bouillonkulturen indessen weitere Differenzierungen auf. Nach 24 Stunden zeigt sich "an der Oberfläche ein feinkörniges, milchweisses Häutchen, darunter eine stark getrübe Schicht und darunter ziemlich klare Nährflüssigkeit. Nach 48 Stunden war das weisse Häutchen etwa 1 mm, die trübe Schicht 10 mm hoch; auch im untersten Teil trat jetzt leichte Trübung ein. — — — Vom sechsten Tage ab war die ganze Nährflüssigkeit gleichmässig trübe und oben

bedeckt von dem dicken weissen Häutchen. Es bildete sich nunmehr auch ein Bodensatz von abgestorbenen Vibrionen." Meine eigenen Befunde stimmen in dieser Hinsicht recht wohl mit diesen Beobachtungen überein, nur dass die Kulturen nach 48 Stunden eine noch weitere Differenzierung aufwiesen und zwar folgendermassen: An der Oberfläche ein deutliches Häutchen, darunter eine etwa 10 mm hohe, stark getrübe Schicht, darunter eine etwa 30 mm dicke Schicht mit nur schwacher Trübung und endlich darunter eine etwa 15 mm hohe, fast völlig klare Schicht. Erst am dritten Tage trat die von *Schäperclaus* beschriebene Schichtung ein und vom vierten Tage ab war die ganze Flüssigkeit unter der Hautschicht gleichmässig getrübt; zu dieser Zeit trat der erste Bodensatz auf. Dieses Verhalten habe ich in allen von mir untersuchten Kulturen beobachtet, mit Ausnahme von Sch I, bei welcher nur eine gleichmässige Trübung unter dem Häutchen zu sehen war. Es können sich also wohl verschiedene Stämme verschiedenartig verhalten und die Angabe bei *Bergman* braucht somit nicht notwendig auf Ungenauigkeit in der Beobachtung zu beruhen. Auch können sich wohl die Verhältnisse in verschiedenartig zusammengesetzten Kulturmedien etwas verschiedenartig gestalten; *Schäperclaus'* Beobachtungen beziehen sich auf Karpfenbouillonkulturen, während ich gewöhnliche Fleischbouillon benützte. Eine charakteristische Schichtung der Bouillonkulturen während der ersten Tage gehört aber wohl meistens zu den kennzeichnenden Merkmalen dieser Vibrionen.

1 %-ige *Peptonwasserkulturen* von Aal I, Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII stimmten mit den bei *Schäperclaus* (1928) beschriebenen anscheinend vollkommen überein, besonders scheinen die anfangs ungetrübe obere Schicht, sowie das Fehlen einer Häutchenbildung charakteristisch zu sein; die bei *Bergman* (1909) und bei *Schäperclaus* (1927) beobachtete Häutchenbildung in gewissen Kulturen habe ich nur in einigen Kulturen mit hohem Salzgehalt von Sch XVII gesehen. Eine obere klare Schicht wird von *Bergman* nicht erwähnt, was vielleicht auf einem Übersehen beruht.

In *Milchkulturen* trat die klare gelbliche Flüssigkeitszone unter der obersten Fettschicht am sechsten bis neunten Tag auf und auch im übrigen stimmten meine Milchkulturen mit der von *Schäperclaus* (1928) gegebenen Beschreibung überein; beim Stamm Sch XVII verliefen aber die späteren Veränderungen viel langsamer als bei den übrigen untersuchten Stämmen (vom Stamm P II wurden keine Milchkulturen angelegt), was wohl darauf hindeutet, dass die Fähigkeit, Milch zu koagulieren, in gewissen Stämmen mit dem Alter schwächer wird oder sogar verloren gehen kann, wie dies

anscheinend bei dem von *Bergman* (1911) erwähnten, zum Vergleich geprüften alten *V. anguillarum*-Stamm der Fall war.

Wie sich *V. anguillarum* und verwandte Vibrionen unserer Küstentische gegenüber *verschiedenen Zuckerarten* verhalten, ist in der Literatur etwas verschieden angegeben. So schreibt *Bergman* (1909 p. 35): "In Bouillon, versetzt mit Dextrose, Lactose, Saccharose oder Maltose kann man kein oder nur geringes Wachstum spüren, und im letzteren Fall bildet sich nicht Säure oder Gas. Im Traubenzuckeragar wächst die Bakterie nur schwach und ohne Gasbildung. Sie besitzt also *nicht die Fähigkeit Gärung* in den genannten *Zuckerarten* zu bewirken." In einer späteren Arbeit (1911) sagt er aber (von mir übersetzt): "In Bouillon von Cibils Fleischextrakt mit verschiedenen Zuckerarten, Lactose, Saccharose, Glucose oder Maltose versetzt, werden vom Stamm Dorsch I (ein gerader Stab; von mir bemerkt) weder Gas noch Säure gebildet. Die fünf Vibriostämme aus Dorschen können diese Zuckerarten dagegen unter Bildung von Säure, aber ohne Gasbildung vergären. Was *Vibrio anguillarum* betrifft, so konnte er Lactose nicht vergären, verhielt sich aber im übrigen wie die anderen Vibrionen. Dies stimmt nicht mit den früheren Gärungsversuchen mit diesem *Vibrio* überein, bei welchen ich keine Spaltung irgendeiner der genannten Zuckerarten beobachten konnte. Die damals verwendeten Kulturen waren indessen unmittelbar vorher reingezüchtet und wuchsen sehr schlecht in Cibils Bouillon, während der bei dieser Gelegenheit benützte Stamm kräftig wuchs." Bei *Schäperclaus* (1927) heisst es (p. 112): "In Peptonwasser, das 1 % Traubenzucker enthält, wächst der *Vibrio* gut. Es entsteht Trübung bis in die äusserste Spitze des geschlossenen Schenkels des Gärröhrchens, Gas wird *nicht* gebildet." und ferner (p. 113): "Zuckerspaltende Fermente können die Vibrionen nicht bilden. Die geringe Erniedrigung des pH's in der Traubenzuckerpeptonwasserkultur ist auf die Kohlensäurebildung infolge der Atmung zurückzuführen. Auch auf andere Weise wird keine Säure gebildet." Bei *Schäperclaus* (1928) dagegen (p. 357): "Weder Milchzucker, noch Trauben-, noch Rohzucker können in Peptonwasserkulturen unter Gasbildung vergoren werden. Während in Milchzuckerlösungen das pH kaum verändert wird, tritt aber in Trauben- und Rohzuckerlösungen bereits nach 12 Stunden Säurebildung ein, das pH sinkt bald auf etwa 5." Bei *Schäperclaus* (1930) wird in der Tabelle VIII (p. 366) angegeben, dass in Traubenzucker kein Gas gebildet wird und dass die Säurebildung nicht unter einem pH-Wert von 4,8 sinkt. Aus allen diesen Beobachtungen geht also unzweideutig hervor, dass sowohl *Bergmans* und *Schäperclaus'* *V. anguillarum* als auch *Bergmans* Dorschvibrionen bei günstigen Kulturbedingungen aus Traubenzucker und anderen Zuckerarten Säure bil-

den. Trotzdem haben *Bruun* und *Heiberg* (1932) die Fähigkeit der von ihnen gefundenen Vibrionen, aus Traubenzucker, Maltose und anderen Zuckerarten Säure zu bilden, als ein differentialdiagnostisches Merkmal dem *V. anguillarum* gegenüber hervorgehoben, was *Schäperclaus* (1934) Veranlassung gab, das Irrtümliche in dieser Auffassung zu betonen und die früheren Befunde zusammenzustellen (1934, p. 208—209); in der allerjüngsten Zeit ist auch, nach brieflicher Mitteilung, die Art *V. anguillcida* von *Heiberg* selbst wieder eingezogen und mit *V. anguillarum* identifiziert worden.

Meine eigenen Befunde stimmen hiermit vollständig überein. Die Stämme Aal I, Aal IV, Aal V, P I und P II wurden unmittelbar nach der Reinzüchtung in Gärröhrchen mit Traubenzuckerbouillon gezüchtet und zwar sowohl bei Zimmertemperatur als auch (für die drei erstgenannten) bei + 37 °C. Nach 5 Tagen war kein Gas gebildet, bei Zusatz von Lackmuslösung wurden aber die bei Zimmertemperatur gehaltenen Kulturen deutlich rotgefärbt, während die bei 37° gezüchteten Kulturen, offenbar wegen des baldigen Absterbens, nur eine sehr schwache Rötung zeigten. Die in ähnlicher Weise bei Zimmertemperatur gezüchteten Stämme Sch I und Sch XVII, der erstere beim Versuche schon über drei Jahre alt, verhielten sich völlig übereinstimmend.

Vor kurzem, als ich mit den Arbeiten von *Bruun* und *Heiberg* (1932) und von *Schäperclaus* (1934) bekannt wurde, stellte ich mit den Stämmen Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII, von welchen Sch I also sieben, die übrigen vier Jahre alt waren, in Dextrose-, Lactose-, Maltose- und Mannit- Lackmusbouillon bei etwa 25 °C neue Gärungsversuche an, die folgendermassen ausfielen: Sämtliche Dextrose- und Maltose-Röhrchen waren schon nach 12 Stunden deutlich rotgefärbt, in den Mannit-Röhrchen trat eine schwächere Rötung erst nach 24 Stunden auf, die aber nach weiteren 24 Stunden ebenso stark war wie in den Dextrose- und Maltose-Röhrchen, in den Lactose-Röhrchen endlich wurde kein deutlicher Umschlag ins Rote bemerkbar; alle Kulturen wurden während 6 Tagen beobachtet.

Als ich bald darauf von Dr. *Heiberg* zwei Stämme des Originalmaterials von *V. anguillcida*, hier als H I und H II bezeichnet, sowie von Dr. *Schäperclaus* die vier als Sch 6, 10, 16 und 24 bezeichneten Stämme des Stralsunder Materiales vom Jahr 1931 erhielt, wurden diese 6 Stämme gegenüber Dextrose, Lactose, Maltose, Saccharose und Mannit geprüft, da sie ja angeblich weder Lactose noch Saccharose noch Mannit verändern sollten. Wiederholte Versuche haben mich überzeugt, dass diese Angaben völlig zutreffend waren; Säure wurde nur in Dextrose und Maltose gebildet, während in Lactose, Saccharose und Mannit kein Umschlag der Lack-

musfarbe stattfand. Mit den Stämmen Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII wurden gleichzeitig Gärungsversuche in Saccharose und Mannit ausgeführt, um die Fehlerquelle einer eventuellen Ungleichartigkeit der Substrate bei verschiedenen Gelegenheiten auszuschalten; alle vier Stämme bildeten aber in diesen beiden Kulturmedien Säure.

Auch hinsichtlich der *Indolbildung* gehen die Angaben etwas auseinander. *Bergman* (1909) gibt an, dass *V. anguillarum* Nitrosoindol bildet, dagegen wird für die Dorschvibrionen mitgeteilt (1911), dass sie zwar Indol, nicht aber Nitrosoindol bilden. *Schäperclaus* (1927, 1928) wies Indolbildung bei den Vibrionen aus Rügen nach, bei sämtlichen aus Lübeck und Stralsund gewonnenen Stämmen (*Schäperclaus* 1934) konnte aber keine Indolbildung festgestellt werden. Auch *Bruun* und *Heiberg* fanden keine Indolbildung bei "*V. anguillicida*" in den ersten drei Tagen.

In Peptonwasserkulturen von Aal I, Aal IV und Aal V fand ich keine Indolbildung nach 24 Stunden (*Salkowski-Reaktion*), nach 48 Stunden war die Reaktion zwar positiv, aber äusserst schwach. Nach 3 Tagen trat Rosafärbung beim Zusatz von Schwefelsäure ein, am stärksten in den Kulturen Aal I und Aal V, und nach 8 Tagen zeigten die Peptonwasserkulturen dieser beiden Stämme beim Zusatz von Schwefelsäure starke Rotfärbung, während die entsprechende Kultur von Stamm Aal IV nur Rosafärbung aufwies. Das Gleiche war bei 10 Tage alten Peptonwasserkulturen der Stämme Sch I und Sch XVII der Fall, also in sämtlichen Fällen deutliche Nitrosoindolreaktion. Auch mit dem Stamm P I erhielt ich ähnliche Resultate.

Von allen diesen Stämmen wurde also sowohl Indol als auch und zwar besonders stark bei Aal I und Aal V, Nitrosoindol gebildet, aber erst in einige Tage alten Kulturen war die Reaktion deutlich; es schien mir deshalb möglich, dass die oben erwähnten negativen Befunde anderer Autoren (ich dachte besonders an die von *Bruun* und *Heiberg*) auf ungenügendes Alter der Kulturen zurückgeführt werden könnten.

Als ich die Stämme H I, H II, Sch 6, 10, 16 und 24 erhielt, bot sich eine willkommene Gelegenheit, diese Vermutung zu prüfen. Sie erwies sich aber als falsch. In 8-tägigen Peptonwasserkulturen dieser Stämme fiel zwar die *Salkowski-Reaktion* sehr schwach positiv aus, als ich aber, um der Sache ganz sicher zu werden, die Stämme Aal IV, Aal V, Sch I, Sch XVII, H I, H II, Sch 6, 10, 16 und 24 im Staatsmedizinischen Laboratorium zu Stockholm einer erneuten Prüfung unterwarf, die derart ausgeführt wurde, dass nach dreitägiger Züchtung in der dort benützten Indolbouillon das *Ehrlich*-sche Reagens zugesetzt wurde, zeigte es sich, dass die Indolprobe nur für die vier ersterwähnten Stämme positiv und zwar für Sch I recht schwach, für die übrigen dagegen negativ ausfiel. Es haben also sowohl *Bruun* und

Heiberg als auch *Schäperclaus* darin recht, dass die genannten Stämme Indol nicht bilden.

Hinsichtlich der *Schwefelwasserstoffbildung* stimmen alle früheren Beobachtungen darin überein, dass *V. anguillarum* H_2S nicht bildet. In Bouillonkulturen von Aal I, Aal IV, Aal V, P I, P II, Sch I und Sch XVII habe ich auch keine Schwärzung von eingehängten Bleiazetatpapierstreifen beobachten können. Dagegen habe ich in einigen Peptonwasserkulturen von Aal IV, Sch I und Sch XVII eine schwache Andeutung einer Schwärzung des Bleipapiers gesehen, was aber wohl nicht genügt, um den erwähnten Stämmen die Fähigkeit der H_2S -Bildung zuzuschreiben.

Reduktionsfähigkeit. Nach *Bergman* (1909) vermag *V. anguillarum* weder Methylenblau noch Neutralrot zu reduzieren, auch die Dorschvibrionen (*Bergman* 1911) waren nicht reduzierend. Bezüglich der Stämme Aal IV, Aal V, P I, P II, Sch I, Sch XVII, H I, H II, Sch 6, 10, 16 und 24 kann ich angeben, dass sie in mit Lackmus versetzten Gärröhrchen die Lackmusfarbe nicht reduzieren.

Hämolyse. Die hämolytische Wirkung von *V. anguillarum* ist, soweit ich sehen kann, von früheren Verfassern nicht geprüft. Ich habe die Stämme Aal IV, Aal V, P I, Sch I und Sch XVII auf Kaninchenblutagarplatten gezüchtet und dabei schon nach 48 Stunden eine kräftige Hämolyse beobachtet.

Was den *Sauerstoffbedarf* anbelangt, bezeichnen *Bergman* (1909, 1911) und *Schäperclaus* (1927, 1928) die von ihnen untersuchten Vibrionen als fakultativ anaërob. Ich habe in dieser Hinsicht nur die Stämme Aal IV und Aal V untersucht und dabei gefunden, dass in Vacuum bei Zimmertemperatur gehaltene Schrägagarkulturen bei weitem nicht so schnell wie bei Luftzutritt, aber doch deutlich wachsen. Auch diese Stämme sind also wohl als fakultativ anaërob zu bezeichnen.

Die *obere Temperaturgrenze* für *V. anguillarum* wird etwas verschieden angegeben. *Bergman* (1909) gibt sie mit + 38 °C an, über die Dorschvibrionen wird (1911) mitgeteilt dass sie bei + 37 °C wachsen, wenn auch langsam. Dagegen sagt *Schäperclaus* (1927), dass bei + 37 °C gehaltene Kulturen nach einigen Tagen absterben und ferner (1928): "Kulturen, die sieben Stunden bei 37° gestanden hatten, liessen sich bereits nicht mehr abimpfen." Später (1934) berichtet aber *Schäperclaus* von Stämmen, die noch bei + 40 °C ungemindertes Wachstum aufwiesen. Die von *Bruun* und *Heiberg* untersuchten Vibrionen starben im allgemeinen bei + 37 °C nach wenigen Tagen ab, in einigen Fällen schon nach 24 Stunden.

Die von mir untersuchten Stämme Aal I, Aal IV und Aal V zeigten bei + 37 °C auf schrägem Agar ein langsames, nach ein paar Tagen aufgehörendes

Wachstum; in Zimmertemperatur übergeführt wuchsen nur vereinzelte Kolonien hervor, was darauf hindeutet, dass die allermeisten Vibrionen durch eine Temperatur von + 37 °C abgetötet wurden. Auch bei derselben Temperatur gehaltene Dextrosebouillonkulturen gingen, wie schon oben erwähnt, nach wenigen Tagen ein. Die in Frage stehenden Vibriostämme sind also wohl als bei + 37 °C nicht mehr lebensfähig zu bezeichnen.

Verhalten gegenüber Kochsalz. Sowohl theoretisch als auch praktisch von grossem Interesse ist das Verhalten der hierhergehörenden Vibrionen zum NaCl-Gehalt des Nährbodens, und schon *Bergman* (1909) hat Versuche darüber angestellt: "Sie wächst in gewöhnlicher Gelatine ohne Zusatz von NaCl, aber langsamer als wenn dieser Stoff beigemischt worden ist, und nur ein geringer Teil des Nährbodens wird verflüssigt. In Gelatine mit Zusatz von 1 % NaCl ist das Wachstum meistens ein üppiges und verläuft die Verflüssigung am schnellsten. Bei Zusatz von 3 % NaCl erkannte man deutlich eine hemmende Einwirkung auf die Vermehrungsfähigkeit der Bakterie und noch mehr, wenn die Kultur 5 % des Stoffs enthielt. Ein Kochsalzgehalt von 7 % ist der höchste, bei dem man in den Kulturen ein Wachstum spüren kann."

Schäperclaus (1927) benutzte 1 % Peptonwasser (*Witte*), von welchem durch Zusatz von chemisch reinem Kochsalz eine Reihe von Reagenzgläsern mit 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 6, 8 und 10 % NaCl hergestellt wurde, die, nach Sterilisierung, mit Vibrionen geimpft wurden. Es entstand Trübung durch Vermehrung der Vibrionen der Gläsern 0,5—6 %, und zwar am stärksten in jenen mit 2 bzw. 2,5 % NaCl-Gehalt. "Einen Salzgehalt von 8 % vermag er nicht mehr zu ertragen. Andererseits ist auch wieder zu ersehen, dass in reinem Süswasser auch bei Zusatz von Pepton der *Vibrio* nicht leben kann." Auch später ist *Schäperclaus* (1934) zu dem gleichen Ergebnis gekommen; nach der Abb. 11, p. 208, sind die Grenzwerte etwa 0,07 und 7,5 % NaCl-Gehalt mit dem Optimum zwischen 1,5 und 3,5 %. Es wird hier ausserdem angegeben, dass die Vibrionen in Wasser mit 0,05 % NaCl ebenso rasch absterben wie in reinem Leitungswasser. Im Gegensatz hierzu geben *Bruun* und *Heiberg* (1932) an, *V. anguillida* sei auch in reinem Süswasser lebensfähig, wozu *Schäperclaus* (1934, p. 209) bemerkt: "Das Wachstum dieser Kulturen bei 0 % Kochsalz beruhte, soweit ich bisher feststellen konnte, auf Verunreinigung durch Kokken."

Selbst habe ich einige Versuche mit den Stämmen Aal IV, Aal V, P I, Sch I und Sch XVII ausgeführt, die im grossen und ganzen die von *Schäperclaus* angeführten Ergebnisse bestätigen, die jedoch durch besondere Umstände von Interesse sein können. Die Kulturen waren seit

2 1/2 Jahren, in einem Falle (Sch I) vielleicht sogar seit 5 1/2 Jahren auf Agar mit gewöhnlichem NaCl-Gehalt gezüchtet. Es wurden Peptonwasserröhrchen mit einem NaCl-Gehalt von 0,5, 2,5, 4,5, 6 und 7 % nach der Vorschrift *Schäperclaus'* (1927) hergestellt und mit Vibrionen geimpft. Nach zehn Tagen zeigten die drei ersten der mit den Stämmen Aal V, P I und Sch XVII geimpften Röhrchen starke Trübung, während die Stämme Aal IV und Sch I nur die zwei ersten, also 0,5 und 2,5 %, getrübt hatten. Nach einer abermaligen Impfung mit Material von den Schrägagarkulturen trat nur die Veränderung ein, dass auch Sch I bei 4,5 % NaCl-Gehalt gutes Wachstum aufwies. Mit dem Stamm Aal IV wurden keine weiteren Versuche vorgenommen. Nach weiteren zehn Tagen wurden aber die übrigen steril gebliebenen Gläschen aufs neue geimpft, aber diesmal nicht mit Material von den Schrägagarkulturen, sondern mit je einer Öse von den entsprechenden 4,5 %-Kulturen. In sämtlichen vier Fällen wurde auf diese Weise gutes Wachstum in den Gläschen mit 6 % NaCl erzielt, für Sch I und Sch XVII auch in denjenigen mit 7 % NaCl. Mit Impfmateriel von der 6 %-Kultur von Aal V erhielt ich schwache Trübung in Peptonwasser mit 6,5 % NaCl, in 7 % aber nicht, mit dem in derselben Weise behandelten Material des Stammes P I konnte spärliches Wachstum aber auch in 7 % NaCl erreicht werden. Hier wurden die Versuche mit den Stämmen Aal V und P I abgebrochen, mit je einer Öse aus den 7 %-Gläschen der Stämme Sch I und Sch XVII, die gutes Wachstum aufwiesen, wurden Peptonwasserröhrchen mit 8 % NaCl-Gehalt geimpft; der Stamm Sch I wuchs hier schlecht, Sch XVII aber fast ebenso gut wie in den früheren Fällen. Es wurden nun Peptonwasserröhrchen mit 8, 8,5, 9, 9,5 und 10 % NaCl bereitet und mit Material von den eben erwähnten 8 %-Kulturen geimpft. Für Sch I trat Wachstum nur in dem 8 %-Gläschen ein, und eine abermalige Beimpfung der steril gebliebenen Gläschen nach 9 Tagen blieb erfolglos. Der Stamm Sch XVII wuchs anfangs recht gut in 8 %, schwächer in 8,5 %, während die drei übrigen Röhrchen steril blieben, und eine Überimpfung von dieser letzten 8,5 %-Kultur in die Röhrchen mit 9, 9,5 und 10 % NaCl-Gehalt war ohne Erfolg.

Da indessen aus diesen Versuchen nicht hervorging, ob die Ergebnisse auf eine allmähliche Angewöhnung zurückzuführen waren, wurde der Versuch mit dem Stamm Sch XVII in folgender Weise wiederholt. Es wurden drei Peptonwasserröhrchen mit 4,5, 6 und 7 % NaCl-Gehalt von einer Schrägagarkultur geimpft; schon nach 2 Tagen trat eine schwache Trübung im 4,5 %-Röhrchen auf, die in den folgenden Tagen immer stärker wurde, während die 6- und 7 %-Röhrchen steril blieben. Nach 8 Tagen wurden diese Röhrchen aufs Neue in derselben Weise geimpft, auch diesmal

ohne Erfolg. Nach weiteren 8 Tagen wurden sowohl die genannten Röhren, als auch frischbereitete mit 6, 7, 8, 8,5 und 9 % Salzgehalt mit Material von dem 4,5 %-Röhren beimpft; schon am dritten Tage wurde eine Trübung sowohl in den alten als auch in den neuen 6- und 7 %-Röhren beobachtet, und dieselbe Erscheinung trat am fünften Tage auch in dem 8 %-Röhren auf, die übrigen Röhren blieben steril. Eine erneute Beimpfung der 8,5- und 9 %-Röhren wurde nach 8 Tagen gemacht und nun wurde, allerdings erst 7 Tage nach der Impfung, auch das 8,5 %-Röhren schwach getrübt. Mit Material aus dieser Kultur wurden nun sowohl das alte 9 %-Röhren als auch frischbereitete 8, 8,5, 9, 9,5 und 10 %-Röhren beimpft; nach 4 Tagen wurde Trübung im 8 %-Röhren, nach 9 Tagen auch im 8,5 %-Röhren beobachtet, die übrigen Röhren blieben, trotzdem sie nach 15 Tagen wiederum mit Material aus dem 8,5 %-Röhren beimpft wurden, völlig steril.

Es ist aus diesen Versuchsreihen zu ersehen, dass die in den alten Kulturen stark herabgesetzte obere Grenze durch Züchtung in einem Medium von mässigem (4,5 %) NaCl-Gehalt wieder nach oben verschoben werden kann, und zwar derart, dass bei zwei Stämmen sogar der bisher festgestellte Grenzwert von 7,5 % um $\frac{1}{2}$ bzw. 1 % übertroffen werden konnte.

Mit diesen Ergebnissen vor Augen lag es ja nahe zu versuchen, ob die Vibrionen nicht auch an geringeren Salzgehalt oder sogar an ein ganz salzfreies Medium gewöhnt werden könnten. Es wurden deshalb in entsprechender Weise, wie früher berichtet, Peptonwasserröhren mit 0,5, 0,25, 0,1, 0,05 und 0 % NaCl-Gehalt hergestellt und mit Material von den Schrägagarkulturen Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII beimpft. Die Ergebnisse waren in allen vier Serien fast gleichartig: gutes Wachstum in den 0,5 und den 0,25 %-Röhren, viel schlechteres in den 0,1 %-Röhren, und zwar am schlechtesten von Stamm Sch XVII, in den 0,05 und 0 %-Röhren wurde dagegen keine Trübung beobachtet. Nach 12 Tagen wurden diese letzterwähnten Röhren wiederum mit Material von den Schrägagarkulturen geimpft und 15 Tage beobachtet, während welcher Zeit keine Trübung der genannten Kulturen entstand. Gleichzeitig mit dieser zweiten Beimpfung der alten Gläschen wurden aber auch frisch bereitete 0,05 und 0 %-Gläschen mit je einer Öse der 0,1 %-Kulturen geimpft. Da auch diese Impfung nach 15 Tagen erfolglos blieb, wurde eine zweite Überimpfung mit Material aus den 0,1 %-Kulturen gemacht und während 28 Tagen beobachtet, ohne dass jedoch auch nur die Spur einer Trübung festgestellt werden konnte. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die 0,1, 0,05 und 0 %-Kulturen nach *Salkowski* auf Indol geprüft; die Reaktion fiel in allen 0,1 %-Gläschen positiv, in den übrigen negativ aus, was gewissermassen als Kontrolle des fehlenden

Wachstums in den beiden letzteren Kulturmedien betrachtet werden kann. Der Versuch, die Vibrionen an einen NaCl-Gehalt von nur 0,05 % oder noch geringer zu gewöhnen, schlug also fehl, wir können folglich den von *Schäperclaus* (1934) angegebenen unteren Grenzwert des erforderlichen NaCl-Gehaltes von etwa 0,07 % als wohlbegründet und zuverlässig betrachten und dürfen kaum mit einer Gewöhnung dieser Vibrionen an stärker ausgesüsstes oder reines Süsswasser rechnen.

Es mag ausserdem bemerkt werden, dass mit Material von einem der 8,5 %-Röhrchen des Stammes Sch XVII Wachstum in 0,1 % direkt erzielt werden konnte; die Erhöhung des oberen Grenzwertes scheint somit keinen Einfluss auf die untere Grenze auszuüben.

4. Pathogenität.

Um die Pathogenität der gefundenen Vibrionen zu prüfen, wurden zuerst mit dem Stamm Aal V einige Infektionsversuche gemacht, die ich hier anführen möchte, da sie für die Beurteilung der Diagnostik der Vibrionen von Bedeutung sind.

Aal A. 49 cm. Am 1. X. 1930 mit 0,3 ccm einer Aufschwemmung einer 5 Tage alten Schrägagarkultur (etwa 1 Öse in 5 ccm 0,85 % NaCl) intraperitoneal an der linken Seite kurz vor dem Anus geimpft. In eine Glaswanne mit schwach durchfliessendem Leitungswasser im Laboratorium eingesetzt.

Am 2. X. Impfstelle als roter Punkt bemerkbar. Am 3. X. Der rote Punkt vergrössert, weiss umrandet, nach aussen von Hautröte begrenzt; Bauch rötlich gefärbt. Am 5. X. Rote Flecke an den Körperseiten hinter dem After. Am 9. X. Etwas schlapp. Am 17. X. Reaktion an der Impfstelle etwas stärker als vorher. Am 21. X. Reaktion wie vorher. Abermalige Impfung wie vorher, aber vorgenommen mit 0,5 ccm der Aufschwemmung, an der rechten Seite eingespritzt. Am 25. X. An der neuen Impfstelle ähnliche Reaktion wie an der ersten. Am 27. X. Die neue Impfstelle etwas vorgewölbt und entzündet. Am 31. X. Die Vorwölbung an der Impfstelle beulenartig, graurotfleckig. Am 1. XI. Beule gross, längsgestreckt in der Längsrichtung des Körpers. (Zwischen 1. und 12. XI. keine Beobachtungen). Am 12. XI. Beule anscheinend soeben aufgebrochen, ihr Inhalt durch eine kleine Öffnung hinten entleert. (Zwischen 12. XI. und 9. XII. keine Beobachtungen). Am 9. XII. Wunde geheilt, die Narbe schwarz punktiert, anscheinend ohne Schleimabsonderung.

Aal B. 49 cm. Am 1. X. 1930 mit 0,3 ccm derselben Aufschwemmung

wie im vorigen Falle zwischen den Brustflossen (intracardial?) geimpft. In denselben Behälter wie Aal A eingesetzt.

Am 2. X. Keine Reaktion an der Impfstelle. Am 3. X. Erweiterung der Hautkapillaren an der Ventralseite. Am 4. X. An der Impfstelle eine nicht rotgefärbte Erhebung der Haut. Am 5. X. Rötliche Streifen in der Haut an der linken Seite der Ansatzstelle der Rückenflosse. Am 6. X. Die rötlichen Streifen stärker ausgeprägt. Am 9. X. Etwas schlapp. Am 10. X. Die Hautrötungen am Beginn der Rückenflosse noch stärker als vorher. Am 11. X. Auffallend schlapp. Am 13. X. Kann mit der Hand festgehalten werden. Am 14. X. Erhebung an der Impfstelle wieder verschwunden, eine ähnliche, etwa erbsengrosse, schwachrötliche Erhebung unter der linken Brustflosse, wenn zurückgelegt. Am 15. X. Die neue Erhebung grösser, stärker rötlich. Am 16. X. Die von nun an als Beule zu bezeichnende Erhebung jetzt bohnergross, rötlich, mit zum Teil aufgelockerter und zeretzter Epidermis; übrige Hautrötungen verschwunden. Am 17. X. Beule jetzt von der Grösse der ausgebreiteten Brustflosse, wie mit Blut erfüllt; Aal noch sehr schlapp. Am 18. X. Beule noch rötlicher, fast ohne Epidermis. Am 19. X. Beule aufgebrochen, Wunde mit zeretztem, rotem Rande, Boden grünlich; Aal etwas lebhafter. Am 20. X. Boden der Wunde etwas vorgewölbt. Am 21. X. Rand der Wunde dunkler rot, Boden weisslich. Am 22. X. Weisslicher Boden der Beule (nekrotisiertes Unterhautgewebe?) weggefallen, eine tiefrote Vertiefung in der Muskulatur zeigend. Am 27. X. Beginnende Heilung der Wunde? — — — Am 12. XI. Wunde sehr seicht, graulich, anscheinend bald geheilt. — — — Am 9. XII. Wunde geheilt, Haut der Narbe schwarz punktiert, anscheinend ohne Schleimabsonderung.

Aal C. Kontrolltier, in denselben Behälter wie A und B eingesetzt; am 12. XI. noch völlig gesund, zwischen 12. XI. und 9. XII. während meiner Abwesenheit aus dem Behälter geschlüpft und durch die Ablaufröhre entwichen.

Aal D. 42 cm. Am 18. X. 1930 mit 0,3 ccm einer 2-tägigen Bouillonkultur des Stammes Aal V intraperitoneal kurz vor dem Anus geimpft. In eine zweite Glaswanne mit schwach durchfliessendem Leitungswasser im Laboratorium eingesetzt.

Am 19. und 20. X. Keine Reaktion an der Impfstelle. Am 21. X. Sehr kräftige Reaktion an der Impfstelle in Form eines grösseren, etwas erhabenen blutroten Fleckes. Am 22. X. Symptome wie vorher, aber noch stärker ausgeprägt. Am 24. X. Die beulenähnliche Erhebung etwas kleiner als vorher. Am 1. XI. Etwa wie vorher. — — — Am 12. XI. An der Impfstelle ein kleiner blutroter Fleck, keine Hautröte in der nächsten Umgebung, keine Erhebung (durch ein kleines Loch entleerte Beule?). — — — Am 9. XII. Aal gesund.

Aal E. Am 18. X. 1930 mit 0,3 ccm derselben Bouillonkultur wie Aal D zwischen den Brustflossen (intracardial?) geimpft. In denselben Behälter wie Aal D eingesetzt.

Am 19. und 20. X. Keine Reaktion an der Impfstelle. Am 21. X. Alle Flossen stark blutgesprengt, rötlicher Fleck an der Impfstelle, ähnliche Flecke auch weiter hinten am Bauche. Am 22. X. Flossen wie vorher, erbsengrosser, nicht erhabener Fleck an der Impfstelle, von dort und hinter der rechten Brustflosse dorsalwärts ein subcutaner Entzündungsherd, hinter der Brustflosse den Charakter einer weniger scharf begrenzten Beule annehmend. Zwei kleinere rotpunktierte Flecke an der Ventralseite, der eine in der Lebergegend, der zweite kurz vor dem After. Am 23. X. Aal eingegangen; Flossen und Flecke am Bauch wie vorher, aber die Haut um den After herum rot punktiert. Die ganze Gegend zwischen den Brustflossen, sowie um die Ansatzstelle der rechten Brustflosse herum als eine einzige, stark entzündete Masse; die unterliegende Muskulatur tiefrot, stark bluterfüllt, Pericardium ebenso, Leber etwas rotfleckig, sonst keine Veränderungen der inneren Organe.

Aal F. 45 cm. Am 18. X. 1930 mit 0,3 ccm einer zweitägigen Peptonwasserkultur des Stammes Aal V intraperitoneal kurz vor dem After geimpft. In denselben Behälter wie D und E eingesetzt.

Erst am 22. X. unbedeutende Rötung an der Impfstelle, die noch am 1. XI. bestand. — — — Am 12. XI. Nichts Bemerkenswertes. — — — Am 9. XII. Aal gesund.

Aal G. 49 cm. Am 18. X. 1930 mit 0,3 ccm derselben Peptonwasserkultur wie Aal F intracardial geimpft. In denselben Behälter wie D, E und F eingesetzt.

Erst am 22. X. unbedeutende Rötung an der Impfstelle. Vom 28. X. an oft auffallend lebhaft, dazwischen schlapp, oft in Seiten- oder Rückenlage. Keine äusseren Krankheitsmerkmale. Bis 12. XI. dann und wann "taumelnd" oder in anderer Weise desorientiert. — — — Am 9. XII. Aal anscheinend gesund.

Aal H. 45 cm. Kontrolltier, in denselben Behälter wie D, E, F und G eingesetzt. Blieb völlig gesund.

Obwohl die mit Peptonwasserkulturen geimpften Aale F und G keine besonderen Krankheitssymptome aufwiesen, sind wohl die Symptome der Versuchstiere A, B, D und E genügend beweiskräftig, um die gefundenen Vibrionen, insofern es auf den benutzten Stamm Aal V ankommt, als pathogen für Aale zu bezeichnen; von besonderer Bedeutung scheinen mir in diesem Zusammenhange diejenigen Fälle zu sein, wo eine deutliche Beulenbildung auftrat, weil sie genau mit jenen Symptomen übereinstimmen, die als charakteristisch für das Originalmaterial von *Vibrio anguillarum* waren.

Später wurden auch Impfversuche mit dem Stamm Aal IV vorgenommen (vgl. weiter unten p. 36); wegen des schlechten Zustandes und damit zusammenhängender Empfindlichkeit der Versuchstiere sind aber diese Versuche für die vorliegende Frage kaum als beweiskräftig anzusehen; ich gehe deshalb auf dieselben in diesem Zusammenhange nicht näher ein, will nur bemerken, dass nichts gefunden wurde, was gegen die Pathogenität des Stammes Aal IV spricht.

5. Agglutinationsversuche.

Agglutination als diagnostische Methode für die oben als *Vibrio anguillarum* zusammengefassten Vibrionen ist nur von *Bergman* (1911) benutzt worden. Er machte von zwei der aus Dorschaugen reingezüchteten fünf Vibriostämmen agglutinierende Kaninchensera. Von dem einen Serum wurde nur der homologe Stamm, als 3 b bezeichnet, in stärkeren Verdünnungen agglutiniert, von dem zweiten Serum aber sowohl der homologe Stamm (2 b) als auch einer der übrigen (3 a), während die Stämme 2 a und 3 c, sowie ein Stamm des Originalmaterialies von *V. anguillarum* auch in einer Verdünnung von nur 1:100 kaum oder gar nicht beeinflusst wurden. Dagegen konnte der oben erwähnte, aus dem Zahnfleisch eines Hechtes reingezüchtete Vibriostamm in ebenso starken Verdünnungen wie die homologen Stämme (1:10.000 bzw. 1:8.000) agglutiniert werden.

Um die eventuelle Identität der verschiedenen mir vorliegenden Vibriostämme auch serologisch zu prüfen, wurde ein agglutinierendes Kaninchenserum durch in üblicher Weise vorgenommene intravenöse Injektion mit dem Stamme Aal V als Antigen hergestellt, das den homologen Stamm bis zur Verdünnung 1:20.480 agglutinierte. Als die Stämme Aal I und Aal IV geprüft wurden, stellte es sich heraus, dass Aal I, der ja wie der homologe Stamm aus dem Blute des untersuchten Aals stammte, ebenfalls bis zur Verdünnung 1:20.480 agglutiniert wurde, während Aal IV ganz unbeeinflusst blieb (schwächste Verdünnung 1:40). Auch die bald darauf erhaltenen Stämme Sch I und Sch XVII konnten mit diesem Serum nicht agglutiniert werden. Ein mit dem Stamm Aal IV hergestelltes Serum agglutinierte den homologen Stamm bis zu 1:10.240, konnte aber die übrigen Stämme nicht agglutinieren. Auch die Stämme Sch I und Sch XVII erwiesen sich in agglutinatorischer Hinsicht als streng spezifisch; beide der mit ihnen hergestellten Kaninchensera agglutinierten nur den homologen Stamm, und zwar in beiden Fällen in einer Verdünnung von 1:2.560. Als ich die aus einem Steinbutt isolierten Stämme P I und P II prüfte, erwiesen sie sich agglutinatorisch als völlig übereinstimmend; ein mit P I hergestelltes Kaninchenserum agglutinierte sowohl den homologen Stamm als auch P II bis zur Verdünnung

1:10.240. Aber auch der Stamm Aal IV wurde mit diesem Serum bis zu 1:5.120 agglutiniert, ebenso wie das mit Aal IV hergestellte Serum den Stamm P I bis zur 1:5.120 deutlich agglutinierte (P II wurde mit diesem Serum nicht geprüft). Es stellte sich also heraus, dass von den hier erwähnten sieben Stämmen Aal I und Aal V einerseits und Aal IV, P I und P II andererseits in agglutinatorischer Hinsicht mit einander völlig übereinstimmen, während die Stämme Sch I und Sch XVII je einen Agglutinationstypus repräsentierten.

Da es sowohl theoretisch als auch praktisch von grossem Interesse war, zu erfahren, ob diese vier Agglutinationstypen eine allgemeinere Verbreitung hatten, oder ob die Zahl der Agglutinationstypen von *V. anguillarum* derart gross war, dass die Verwendung der Agglutinationsmethode als Diagnosticum dadurch verringert wurde, erbat ich mir von den Herren Dr. *Schäperclaus* und Dr. *Heiberg* weiteres Material und erhielt von ihnen in liebenswürdigster Weise die oben besprochenen, als Sch 6, 10, 16 und 24 bzw. H I und H II bezeichneten Stämme. Keiner von diesen konnte aber mit den von mir hergestellten Sera agglutiniert werden (ich sehe davon ab, dass in der Verdünnung 1:40 vom Serum Sch I eine schwache Flockung des Stammes H I zu bemerken war), mit einem mit dem Stamm H I bereiteten Serum gelang es jedoch, sämtliche dieser neuen Stämme zu agglutinieren, während die Stämme Aal IV, Aal V und Sch XVII ganz unbeeinflusst blieben und Sch I nur in der Verdünnung 1:40 agglutiniert wurde. Eine Übersicht über die mit den Kaninchen-Antisera gewonnenen Ergebnisse ist in der Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1.

Stamm	Kaninchenantiserum					
	Aal V	Aal IV	P I	Sch I	Sch XVII	H I
Aal V	1:20.480	—	—	—	—	—
Aal I	1:20.480	—	—	—	—	—
Aal IV	—	1:10.240	1:5.120	—	—	—
P I	—	1:5.120	1:10.240	—	—	—
P II	—	—	1:10.240	—	—	—
Sch I	—	—	—	1:2.560	—	1:40
Sch XVII	—	—	—	—	1:2.560	—
H I	—	—	—	1:40	—	1:2.560
H II	—	—	—	—	—	1:2.560
Sch 6	—	—	—	—	—	1:2.560
Sch 10	—	—	—	—	—	1:2.560
Sch 16	—	—	—	—	—	1:2.560
Sch 24	—	—	—	—	—	1:2.560

6. Zusammenfassung; Systematisches.

Wenn wir davon absehen, dass der Stamm Aal IV die Fähigkeit besitzt, in Schrägagarkulturen das Substrat braun zu färben und auf Kartoffeln, unter allmählicher Schwärzung des Substrats, statt der üblichen honiggelben Farbe eine mehr graugrüne anzunehmen, so stimmen die von mir reingezüchteten Stämme Aal I, Aal IV und V sowie P I und P II in allen oben näher behandelten Hinsichten mit den von früheren Verfassern als *Vibrio anguillarum* Bergman bezeichneten Vibrionen derart gut überein, dass sie wohl ohne weiteres auch als dieser Art angehörig betrachtet werden müssen.

Nach unseren gegenwärtigen Erfahrungen kann für *V. anguillarum* folgende, die wichtigsten Merkmale enthaltende *Diagnose* gegeben werden: *kommaförmige, monotriche, lebhaft bewegliche, gramnegative Spaltpilze ohne Sporen- und Kapselbildung; Gelatine wird verflüssigt, Gelatinestich cholera-ähnlich; keine Gas-, aber Säurebildung in Trauben- und Malzzucker, keine H₂S-Bildung, keine Reduktionsfähigkeit; hämolytisch* (nur für wenige Stämme festgestellt), *halophil* (untere NaCl-Grenze etwa bei 0,07 %), *fisch-pathogen*.

So charakterisiert muss der Begriff *V. anguillarum* auch die von Bruun und Heiberg neu aufgestellte Art *V. anguillicida* umfassen, wie schon Schäperclaus (1934) bemerkt und die beiden dänischen Forscher brieflich auch selbst zugestanden haben. Ebenso sind die von Bergman (1911) beschriebenen Vibrionen aus augenkranken Dorsche meines Erachtens wohl am besten zu *V. anguillarum* zu rechnen, auch wenn sie von Bergman selbst nur als den *V. anguillarum* nahestehende Vibrionen bezeichnet werden, offenbar bloss aus dem Grunde, weil die von ihnen hervorgerufene Krankheit der roten Beulenkrankheit des Aals so unähnlich war.

Innerhalb der so umschriebenen Art begegnen uns aber einige Merkmale, die, wie wir oben fanden, nicht ganz einheitlich sind, was schon Schäperclaus (1934 p. 207) bemerkt hat: "Zusammenfassend ergibt sich, dass der Abbau von Rohrucker und Mannit, die Bildung von Indol und das Wachstum bei Temperaturen von 37—40° offensichtlich Schwankungen unterworfen sind. Es ist m. E. nicht ausgeschlossen, dass die Schwankungen z. T. in unkontrollierbaren Änderungen der Versuchsbedingungen ihre Ursache haben, denn es ist natürlich unmöglich, die Beschaffenheit der Nährmittel und die Umweltverhältnisse Jahre hindurch völlig konstant zu halten. Aber auch ohnehin sind Schwankungen möglich." Auch Bergmans

(1911) Angabe, die Dorschvibrionen könnten auch in Milchzucker Säure bilden, ist an dieser Stelle zu nennen.

Für Verschiedenheiten hinsichtlich der oberen Temperaturgrenze können wohl die Versuchsbedingungen ausschlaggebend sein, vielleicht ist auch hier mit einer allmählichen Angewöhnung zu rechnen. Wenn es aber auf die Eigenschaften Zuckerabbau und Indolbildung ankommt, scheinen mir die angegebenen Schwankungen gar nicht so unregelmässig zu sein, wie es beim ersten Blick den Anschein hat. In nebenstehender Tabelle (Tab. 2) habe ich alle mir zugänglichen Angaben über Zuckervergärung und Indolbildung der in Rede stehenden Vibrionen zusammengestellt. Wenn wir zuerst von den Dorschvibrionen absehen, welche sich durch die angebliche Säurebildung in Milchzucker von allen übrigen Stämmen unterscheiden, so ergibt sich, dass mit einer einzigen Ausnahme (1 Stamm aus Lübeck 1932) die Stämme, welche aus Saccharose und Mannit keine Säure bilden, auch dieselben sind, welche Indol nicht bilden. Ich möchte hier besonders hervorheben, dass meine Ergebnisse hinsichtlich Gärung und Indolbildung gleichzeitig, also mit ganz denselben Substraten, für sämtliche von mir untersuchten Stämme zutrafen, so dass von Schwankungen der Versuchsbedingungen hier kaum

Tabelle 2.

M a t e r i a l	Dextrose	Lactose	Maltose	Saccharose	Mannit	Indol	U n t e r s u c h e r
Dorschvibrionen 1910.....	S	S	S	S		+	Bergman (1911)
Vibrio anguillarum, Originalstamm	S	O	S	S		+	Bergman (1911)
» » Aal 1925.....						+	Schäperclaus (1927)
» » Hecht 1927.....	S	O		S		+	Schäperclaus (1928)
» » » , davon							
» » Sch I.....	S	O	S	S	S	+	Eigene Unters.
» » Saale 1930.....	S	O	S	S	S		Schäperclaus (1934)
» » » , davon							
» » Sch XVII.....	S	O	S	S	S	+	Eigene Unters.
» » Aal 1930 (Aal IV —V).....	S	O	S	S	S	+	Eigene Unters.
» » Lübeck 1932, 1 Stamm.....	S	O	S	S	S	—	Schäperclaus (1934)
» »anguillicida», Dänemark 1931	S	O	S	O	O	—	Bruun & Heiberg (1932)
» » » » » ,							
» » davon HI, HII.....	S	O	S	O	O	—	Eigene Unters.
» »anguillarum, Lübeck 1932, 5 Stämme.....	S	O	S	O	O	—	Schäperclaus (1934)
» » Stralsund 1931, 5 Stämme.....	S	O	S	O	O	—	Schäperclaus (1934)
» » Stralsund 1931, davon Sch 6, 10, 16, 24.....	S	O	S	O	O	—	Eigene Unters.

die Rede sein kann. Es ist ferner zu bemerken, dass alle sechs Stämme dieser Gruppe, die ich untersuchen konnte, in agglutinatorischer Hinsicht völlig identisch waren. Legen wir ferner hinzu, dass sie alle den Aalseuchen der deutschen und dänischen Küstengewässer in den Jahren 1931 und 1932, also einer sowohl zeitlich als auch räumlich einheitlichen Epidemie entstammen, so liegen wohl genügend viele Merkmale vor, um sie als einen besonderen Formenkreis zu betrachten. Ein "anguillicida"-Typus ist also meines Erachtens sehr wohl unterscheidbar, jedoch mit ganz anderen Merkmalen als den von *Bruun* und *Heiberg* verwendeten zu begründen. Wie aus dem schon Gesagten hervorgeht, halte ich es aber nicht für angemessen, diesen Typus als besondere Art aufzustellen, vor allem aus dem Grunde, weil die hierhergehörenden Vibrionen als Krankheitserreger mit dem "echten" *V. anguillarum* anscheinend völlig übereinstimmen. Dagegen scheint es mir zweckmässig, zwei Formen von *V. anguillarum* zu unterscheiden, die folgendermassen zu charakterisieren sind:

A. Säurebildung in Saccharose und Mannit, Indolbildung.

B. Keine Säurebildung in Saccharose und Mannit, keine Indolbildung.

Wenn man sich nicht damit begnügen will, ganz einfach von *anguillarum A* bzw. *anguillarum B* zu sprechen, so ist wohl der erste Typus als *V. anguillarum* f. *typica* zu bezeichnen. Die Originalstämme von *Bergmans V. anguillarum* sind zwar nicht mehr vorhanden, und alle meine Bemühungen, beulenranke Aale vom ursprünglichen Fundort zu erhalten, waren, wie schon gesagt, erfolglos; aus *Bergmans* Beschreibungen von *V. anguillarum* aus beulenkranken Aalen geht indessen unzweideutig hervor, dass die denselben zugrundeliegenden Vibrionen dem oben erwähnten A-Typus angehörten. Für den B-Typus wäre dann der Namen *V. anguillarum* f. *anguillicida* zu wählen. Ob wir ausserdem einen eine besondere Augenkrankheit hervorrufenden, Lactose-vergärenden C-Typus bzw. f. *ophthalmica* unterscheiden können, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten werden; auch in diesem Falle ist nämlich das Originalmaterial nicht mehr vorhanden und es scheint mir eine Bestätigung der *Bergmanschen* Angaben notwendig, bevor sie für die Aufstellung eines besonderen Gärungstypus benutzt werden können. Für den sich angeblich intermediär verhaltenden Lübeck-Stamm kann dagegen meines Erachtens keine besondere Form aufgestellt werden; möglicherweise kann es sich um einen Stamm des A-Typus mit aussergewöhnlich schwachem Indolbildungsvermögen handeln.

II. Beziehungen von *Vibrio anguillarum* zum Wirt.

1. Krankheitserscheinungen.

Zu den eingehenden Berichten der von *Vibrio anguillarum* verursachten Krankheitserscheinungen, die von *Bergman* (1909) und vor allem von *Schäperclaus* (1927, 1928, 1934), sowie auch von *Bruun* und *Heiberg* (1932) veröffentlicht wurden, habe ich eigentlich sehr wenig Neues hinzuzufügen, nur in einigen Punkten habe ich Beobachtungen gemacht, die zur Kenntnis der Rotseuche des Aals beitragen können.

Die Symptome des Aals, der mir das erste Untersuchungsmaterial lieferte, sind schon oben angegeben. Die Hautrötungen der Körperseiten und um den After herum sind ja Merkmale, die bei Infektionen mit *V. anguillarum* häufig zu beobachten sind, und die zusammen mit dem Auffinden von Vibrionen im Blute wohl ohne weiteres die Diagnose Salzwasseraalrotseuche rechtfertigen. Dass aber die starke Erweiterung des Magens als eine Erscheinung betrachtet werden muss, die mit der Rotseuche nichts zu tun hat, auch wenn sie ebenfalls von einer Infektion hervorgerufen wurde, ist wohl anzunehmen, da dieses Symptom, soviel ich sehen kann, im Zusammenhange mit dieser Krankheit sonst nie beobachtet wurde. Welche von den aus dem Mageninhalt reingezüchteten Spaltpilzen diese Auftreibung des Magens hervorriefen, ist natürlich nicht leicht zu sagen, zum Teil schon deswegen, weil die Probe ohne vorherige Sterilisierung der äusseren Magenwand entnommen wurde; es ist natürlich sehr wohl möglich, dass die hier gefundenen Vibrionen dem matten Belag der peritonealen Wandung des Magens entstammten. Unter allen Umständen ist also kein genügender Grund zur Annahme vorhanden, dass die Vibrioinfektion vom Magen aus stattgefunden hatte, und zwar besonders deshalb, weil die "Magenvibrionen" (Stamm Aal IV) mit den aus dem Blute gezüchteten (Stämme Aal I und Aal V) nicht identisch waren.

Die Art und Weise der natürlichen Infektion bei der Salzwasseraalrotseuche ist noch eine offene Frage. Sowohl *Bergman* (1909), als auch *Schäperclaus* (1927) haben durch Fütterungsversuche gezeigt, dass eine Infektion per os sehr wenig wahrscheinlich ist. *Bergman* ist der Ansicht, dass wir es mit einer Wundinfektionskrankheit zu tun haben, und zwar auf Grund der von ihm stets gefundenen, scharf umschriebenen Beulen, "obgleich man keinen Defekt der Haut über dem Herd in den Anfängen der Krankheit hat beobachten können", und *Schäperclaus* hielt eine

Infektion durch Haut und Kiemen für wahrscheinlich. Die Ergebnisse der schon oben angeführten Impfversuche stützen indessen nur zum Teil die Auffassung *Bergmans*; es wurde ja beim Versuchstier A, zum Teil auch bei D, eine Beule an der Impfstelle gebildet, beim Versuchstier B aber, bei welchem die Beulenbildung am charakteristischsten verlief, trat die Beule nicht an der Impfstelle zwischen den Brustflossen, sondern hinter der Ansatzstelle der linken Brustflosse auf, nachdem die Primärreaktion an der Impfstelle schon wieder verschwunden war. Die Erklärung der Beulenbildung als direkt durch eine Wundinfektion entstanden, ist somit nicht in allen Fällen stichhaltig. Auch die von *Schäperclaus* (1927) ausgesprochene Ansicht, die Beulen entstünden nur bei einem Salzgehalt von mindesten 2 %, während bei Impfaalen, die in Wasser von geringerem Salzgehalt oder in Süßwasser gehalten wurden, eine Beulenbildung nicht einträte, stimmen nicht mit meinen Versuchen überein, die ja sämtlich mit fließendem Süßwasser vorgenommen wurden. Die Ansicht scheint ausserdem später von *Schäperclaus* selbst aufgegeben worden zu sein; in seiner letzten Arbeit (1934) sagt er nämlich nach der Erwähnung der verschiedenen Symptome, unter welchen die Salzwasseraalrotseuche auftreten kann (l. c. p. 202): "Am häufigsten waren auch bei der Salzwasseraalseuche die Fälle, in denen äussere Krankheitsmerkmale völlig fehlten, und zwar anscheinend *um so mehr, je verderblicher der Verlauf der Seuche wurde*. Offensichtlich sterben die Aale, ähnlich wie ich es bei andern Fischseuchen (z. B. bei infektiöser Bauchwassersucht, 16, S. 324) beschrieb, bevor sich die Rotfärbungen bilden. *Die Infektion ist dann eine allgemeine, im Gegensatz zu den mehr örtlichen Erkrankungen bei Geschwürbildung und Rotfärbung*. Im Vergleich zur Süßwasseraalseuche traten aber die Rotfärbungen und die Geschwürbildungen doch verhältnismässig häufiger auf."

Im Anschluss hieran, sowie auf meine eigenen Untersuchungen gestützt, bin ich zu der Überzeugung gekommen, dass die verschiedenen äusseren Krankheitsmerkmale den verschiedenen Ausfall des Zweikampfes zwischen den Krankheitserregern und den natürlichen Abwehrmitteln des Körpers abspiegeln, und zwar so, dass das Fehlen der äusseren Merkmale auf eine allgemeine Septikämie deutet, gegenüber welcher die Abwehrmittel des Körpers machtlos sind, während das andere Extrem, die Beulenbildung, dadurch zu erklären ist, dass die Erreger durch die genannten Abwehrmittel auf ein scharf begrenztes Gebiet isoliert werden. Die verschieden stark ausgeprägten Hautrötungen an Körper und Flossen können sozusagen als Zwischenstufen zwischen diesen extremen Typen aufgefasst werden. Bei starker Virulenz des Erregers, vor allem wenn die körperlichen Abwehrmittel gleichzeitig herabgesetzt sind, wird also der erstere Typus vorherrschen, im entgegengesetz-

ten Falle dagegen der zweite, was ja auch mit den Erfahrungen bei Aalseuchen im Einklang steht; so berichtet z. B. *Schäperclaus*, dass bei den Massensterben in den Jahren 1931—32 der erstere Typus vorherrschte (vgl. eben angeführtes Zitat), während bei der zuerst von *Bergman* beschriebenen Aalseuche bei Limhamn, wo fast alljährlich kranke Aale zu finden sind, ohne dass grösseres Massensterben beobachtet wurde, das Vorkommen von Beulen fast die Regel ist. Es herrscht also offenbar der anscheinend widersprechende Umstand, dass diejenigen der angegriffenen Aale, an denen man keine Symptome wahrnimmt, die am schwersten erkrankten darstellen, welche einem ebenso sicheren wie baldigen Tode anheimfallen, während die mit den oft abscheulichen Beulen versehenen in der Tat die widerstandsfähigsten sind, die auch nicht selten völlig genesen.

In diesem Zusammenhange möchte ich auch erwähnen, dass ich bei den in meinen Versuchen überlebenden Aalen A und B sowie bei zwei anderen, mit Stamm Aal IV bzw. Sch XVII geimpften Aalen, nachdem sie die Infektionen überstanden und sich völlig erholt hatten, keine Vibrionen aus der Galle gewinnen konnte, und Kulturen mit Material aus dem Darne der Impfaale D, F und G blieben auch steril. Nach *David* (1927) soll bei jenen Fischen, die eine Infektion mit seinem *Vibrio piscium* überstanden haben, der Erreger noch lange in der Gallenblase reichlich vorhanden sein, so dass diese Fische als "Bazillenträger" bezeichnet werden können. Etwas ähnliches scheint also bei *V. anguillarum* nicht vorzukommen, was natürlich mit Rücksicht auf die Beurteilung der Ansteckungsmöglichkeiten durch genesene Aale von Bedeutung ist.

2. Zur Kenntnis der natürlichen Abwehrmittel der Fische gegen Bakterien.

Die natürlichen Abwehrmittel der höheren Organismen gegen Bakterieninfektionen bestehen bekanntlich teils in Phagozytose, d. h. im Unschädlichmachen der Eindringlinge durch die Wirksamkeit der weissen Blutkörperchen, teils in Bildung von Antikörpern verschiedener Art.

Phagozytose. Dass auch bei Fischen die weissen Blutkörperchen in den Körper hineingelangte Bakterien angreifen und auffressen, ist schon bekannt (vgl. z. B. *Aaser* 1925), auch bereits bei Infektionen mit *V. anguillarum*; so fand *Bergman* (1909, p. 48) bei einem Impfaal, dass die weissen Blutkörperchen mit Vibrionen beladen waren, und *Schäperclaus* (1928 p. 354) erwähnt diese Erscheinung für kranke Hechte aus Rügen. Im Blut-

ausstrich von dem schon oben erwähnten Versuchsaal E waren gleichfalls in Leukozyten eingeschlossene Vibrionen nicht selten zu sehen.

Antikörperbildung. Die Frage über Immunität und Antikörperbildung bei Fischen scheint sehr wenig erforscht zu sein. Es ist zwar wiederholt angenommen worden, teils dass den Fischen eine angeborene, natürliche Immunität gegen die meisten Wasserbakterien zukommt (vgl. z. B. *Plehn*, 1924 p. 451), teils dass sie gegen Krankheitserreger eine gewisse Immunität erwerben können, wie z. B. die Salmoniden Mitteleuropas gegen die Furunkulose, die nunmehr nicht so verheerend erscheint wie vor etwa 20 Jahren, oder die Aale gegen die Rotseuche (vgl. *Schäperclaus* 1927 p. 118, 1930 p. 299—300 und p. 349, 1934 p. 213). Direkte Beobachtungen über Fälle von erworbener Immunität oder Bildung von Antikörpern irgendeiner Art scheinen dagegen recht spärlich zu sein. Aus der Literatur ist mir nur folgendes bekannt:

1) Im Anschluss an eine angeblich durch "*Proteus piscicidus versicolor*" hervorgerufene Fischepidemie, deren Beschreibung aber eher auf ein Massensterben durch Sauerstoffmangel hindeutet (vgl. *Hofer* 1904 p. 26), fanden *Babes* und *Riegler* (1903) folgendes: "Interessant sind in dieser Beziehung noch unsere Versuche, mittels Blutes der kranken Fische unseren Bacillus zu agglutinieren. In der Tat ist selbst bei akutem Verlaufe, also schon nach 24 Stunden dauernder Krankheit, das Blut imstande, im Verhältnis von 1:50 und oft auch mehr die Bacillen zu agglutinieren. Dieses Vermögen ist aber noch gesteigert, wenn die Fische länger leben.

Wenn man nun solches Blut oder Serum etwa im Verhältnis von 1:20—1:50 mit lebhaft beweglichen *Proteus vulgaris*-Kulturen zusammenbringt, erfolgt keinerlei Agglutination.

Auch *Proteus vulgaris* aus dem Darms tranker Fische zeigt keine oder ganz geringe Agglutination gegenüber dem Blute kranker Fische."

Babes und *Riegler* gebührt somit das Verdienst, zuerst auf den Gedanken gekommen zu sein, dass auch Fische Agglutinine bilden könnten.

2) Während seiner eingehenden Untersuchungen über die Hechtpest in Norwegen 1923, wo als Erreger ein *Vibrio* festgestellt wurde, hatte auch *Aaser* (1925) seine Aufmerksamkeit auf diese Frage gerichtet; er fand, dass das Blutserum kranker Hechte Vibrionen aus anderen kranken Hechten in Verdünnungen bis 1:100 agglutinieren konnte; mit Sera aus normalen Hechten wurde indessen keine Agglutination beobachtet. *Aaser* zog hieraus die Schlussfolgerung, dass die in den kranken Hechten gefundenen Agglutinine durch die Tätigkeit der Vibrionen gebildet worden waren.

Diese Angaben, die sich hauptsächlich auf in der Natur erkrankte Fische beziehen (in *Aasers* Material sind auch drei künstlich infizierte Fische mit

inbegriffen), sagen ja eigentlich über die vorliegende Frage recht wenig; im ersteren Falle ist ja die Ätiologie der Krankheit ziemlich unsicher und bezüglich der Angaben von *Aaser* hebt der Autor selbst hervor, dass die Serumgewinnung aus den kranken Hechten mit derart grossen Schwierigkeiten verbunden war, dass kein reines Serum erhalten werden konnte. "Der Agglutinationsprüfung mit Serum aus kranken oder spontan gestorbenen Hechten kann deshalb nur qualitative Bedeutung zugemessen werden, während man von einer quantitativen Beurteilung absehen muss" (*Aaser*, l. c. p. 59; von mir übersetzt).

Über aktive Immunisierungsversuche bei Fischen ist mir dagegen aus der Literatur nichts bekannt, falls nicht hierzu folgende Bemerkung bei *Schäperclaus* (1934, p. 210) gerechnet werden kann: "Agglutinationsversuche mit Karpfenimmenserum, das vorschriftsmässig durch Injektion von Stralsunder Vibrionen hergestellt worden war, schlugen fehl. Aber auch Agglutinationsversuche des gleichen Serums mit jahrealten Stämmen von *Vibrio anguillarum* aus pestkranken Hechten von Rügen verliefen negativ. Der Titer des Immunserums war allerdings sehr niedrig, er betrug nur 5—10."

Als mir nach Ablauf der oben (p. 20 ff.) geschilderten Impfversuche einige Aale zur Verfügung standen, die sich nach schweren Infektionen mit *Vibrio anguillarum* wieder erholt hatten, bot sich eine willkommene Gelegenheit zu prüfen, ob sie nach überstandener Krankheit Antikörper gegen den eingepflichten Vibriostamm gebildet hätten oder mit anderen Worten, ob Fische eine aktive Immunität erwerben können. Es wäre natürlich sehr interessant gewesen zu erfahren, ob sie gegen eine Neuinfektion mit demselben Stamm Immunität erworben haben; Versuche in dieser Richtung auszuführen, stiess indessen auf die Schwierigkeit, die für normale Aale tödliche Dosis dieser Vibrionen sicher festzustellen. Ich habe mich deshalb bis auf weiteres damit begnügt, die eventuelle Bildung von Agglutininen festzustellen; die Untersuchungen von *Babes* und *Riegler* sowie von *Aaser* waren mir damals unbekannt.

Bevor ich aber auf meine Untersuchungen über Agglutininbildung bei Fischen eingehe, möchte ich eine Agglutinationsmethode kurz erwähnen, die mir während meiner Arbeit grosse Dienste geleistet hat und die ich den Fachgenossen zum Gebrauch empfehlen möchte. Es ist das von *Wassén* (1930) eingeführte Agglutinationsverfahren in halbfestem Agar. Die Methode gründet sich erstens auf den Umstand, dass bewegliche Bakterien in halbfestem Agar durch ihre Schwimmbewegungen von einer Impfstelle aus konzentrisch das Medium unter Trübung desselben durchsetzen und zweitens darauf, dass, wenn man einen mit Serum durchtränkten Fliesspapierstreifen in den Agar einsetzt, das Serum vom Papierstreifen in den Agar hinaus-

diffundiert. Wenn man nun gleichzeitig mit dem Einimpfen einer Reinkultur von Bakterien in einiger Entfernung von der Impfstelle ein dieses Bakterien agglutinierendes Serum einbringt, so werden die Geisseln der ausschwärmenden Bakterien in einigem Abstand vom Papierstreifen gelähmt und die Bakterien in ihrem weiteren Vordringen gehindert; es entsteht in dieser Weise in dem sonst gleichmässig getrübbten Medium eine meistens scharf begrenzte klare Zone um den Papierstreifen herum. Wird ein nicht agglutinierendes Serum gewählt, so entsteht keine derartige klare Zone, das Medium wird überall gleichmässig durchwachsen und getrübt. (Vgl. *Wassén* Fig. 2.)

Die Zusammensetzung des Mediums ist nach *Wassén*: Pepton 30, Fleischextrakt 10, NaCl 3, Agar-agar 3,5 bis 4, Wasser 1,000. Wird wie gewöhnlicher Agar hergestellt (pH 7,2). Als Kulturgefässe werden zweckmässig gewöhnliche Spitzgläser benützt, die, mit einer Papierhülse bzw. einem Deckel aus rostfreiem Blech bedeckt, im Trockensterilisator entkeimt werden. Die Papierstreifen werden aus dickem Fliesspapier, etwa in der Grösse 20 × 5 mm geschnitten, und vor dem Gebrauch in einem Doppelschälchen oder dergl. sterilisiert. Der Agar wird heiss in die Gläser gegossen und muss vor dem Gebrauch gut abgekühlt sein, so dass er eine halbstarre Konsistenz annimmt. Es wird dann das Bakterienmaterial mit einer Öse eingestochen, der Papierstreifen mit einer abgebrannten Pinzette an einem Ende gefasst, in das Serum eingetaucht und dann in den Agar hineingesetzt. Werden nur ein bis drei Sera auf einmal verwendet, so können sowohl das Bakterienmaterial als auch die Papierstreifen peripher eingebracht werden, wobei aber darauf zu achten ist, dass sie die Wand des Glases nicht berühren; werden aber mehrere, z. B. 4—5 Sera gleichzeitig geprüft, so ist es zweckmässig, das Bakterienmaterial zentral einzuimpfen, weil die Papierstreifen in gewissem Abstand von einander stehen müssen. Das Glas wird dann zweckmässig mit der Papierhülse bzw. dem Deckel wieder bedeckt, um Verunreinigung aus der Luft zu vermeiden, und sich selbst überlassen. Nach 24 Stunden, bei schnell beweglichen Bakterien oft schon früher, ist die Durchwucherung des Agars meistens vollendet und das Resultat abzulesen.

Diese Methode der Agglutinationsprüfung bietet in der Praxis wegen ihrer Einfachheit gegenüber der sonst üblichen, recht umständlichen und zeitraubenden Röhrenagglutination grosse Vorteile, wenn es nur darauf ankommt, eine Diagnose zu stellen; die Methode ist nämlich nur qualitativ, und sagt somit über den Agglutinationstiter nichts. Auch habe ich gefunden, dass die zu verwendenden Sera einen Titer von wenigstens 1:320 haben müssen, um eine Agglutinationszone um den Papierstreifen herum sicher hervorzubringen; in gewissen Fällen habe ich allerdings mit Sera, die einen Agglutina-

tionstiter von nur 1:160 hatten, auch positive Ergebnisse erhalten. Ein negativer Ausfall mit einem unbekanntem Serum braucht also nicht zu bedeuten, dass es Agglutinine völlig entbehrt. Aus diesem Grunde kann die Methode z. B. für das Feststellen einer beginnenden Agglutininbildung nicht verwendet werden. Andererseits können hochwertige Sera bei Prüfungen von unbekanntem Bakterien ohne Nachteil mit 0,5 % Karbollösung im Verhältnis 1:4 verdünnt werden.

Von diesen Einschränkungen abgesehen, hat die Methode eine vielseitige Verwendung. Als Beispiel kann angeführt werden, dass als die Beule des früher erwähnten Impfaals B aufbrach, Material von deren Inhalt mit einer sterilen Öse entnommen und in ein *Wassén*-Glas gestochen wurde, das mit einem in Kaninchenantiserum des Stammes Aal V eingetauchten Papierstreifen versehen war; schon nach 14 Stunden trat die Agglutinationszone auf und im Ausstrich aus dem Agar waren nur Vibrionen zu sehen. Von dem nach 5 Tagen verendeten Impfaal E wurde je ein Glas mit Schwanzblut, mit Blut aus dem Pericard und mit Material aus der entzündeten Muskulatur, alles steril entnommen, beimpft und mit einem mit Aal V-Serum durchtränkten Papierstreifen versehen; am folgenden Tage waren alle drei Gläser ausgewachsen und positiv; in den Ausstrichen nur Vibrionen. Es konnte also in diesen beiden Fällen mit einem Mindestmass von Arbeit und Zeitaufwand festgestellt werden, dass die Krankheitssymptome von den eingepflichten Vibrionen hervorgerufen worden waren.

Aber nicht nur als bequemes Agglutinationsmedium ist dieser Agar verwendbar; bei Prüfung der eventuellen Beweglichkeit von Bakterien, beim Reinzüchten von Kulturen beweglicher Bakterien, die durch Kokken, Schimmelpilze oder andere unbewegliche Organismen verunreinigt wurden, sowie in vielen anderen Fällen leistet die Verwendung des halbfesten Agars gute Dienste.

Kehren wir jetzt zu der Untersuchung der Impfaale zurück. Am 10. XII., also 70 Tage nach der ersten Injektion von Aal A, wurden folgende Versuche gemacht. Zwei *Wassén*-Gläser wurden mit Material aus einer Schrägagarkultur des Stammes Aal V geimpft; in dem einen Glas wurde ein Fliesspapierstreifen eingesetzt, der vorher mit Blut durchtränkt war, das durch Herzpunktion mittels einer sterilen Rekordspritze dem Aal A entnommen wurde, in dem zweiten Glas wurde ein Papierstreifen eingesetzt, der in ähnlicher Weise entnommenes Blut eines am selben Tag eingekauften, gesunden Aals enthielt. Als Kontrolle wurde in beiden Gläsern je ein mit Kaninchen-Antiserum des Stammes Aal V durchtränkter Papierstreifen eingesetzt. Schon nach 10 Stunden war der Agar der beiden Gläser völlig durchgewachsen; sowohl um die Papierstreifen mit Kaninchenserum als auch

um die mit Blut des Aals A durchtränkten war aber eine klare Zone entstanden, während die Vibrionen am Papierstreifen mit Blut des gesunden Aals nicht gehemmt worden waren. Es war also deutlich, dass das Blutserum des Aals A Agglutinine gegen die Vibrionen enthielt, das des gesunden Aals dagegen nicht, wenigstens nicht in grösseren Mengen.

Am 29. XII. wurden sowohl dem gesunden Aal vom 10. XII., als auch den Impfaalen A und B das Blut in der Weise steril entnommen, dass die Haut in der Herzgegend mit Alkohol gewaschen und leicht abgebrannt wurde, wonach das Pericard geöffnet, das Herz angeschnitten und das ins Pericard herausströmende Blut mittels einer sterilen Rekordspritze ohne Kanüle aufgesaugt und in ein steriles Röhrchen gebracht wurde. Nach vollendeter Koagulation wurden die Sera abpipettiert und mit $\frac{1}{10}$ des Volumens einer 5 % Karbollösung versetzt.

Die so gewonnenen Sera sowie das Kaninchenantiserum Aal V wurden in *Wassén*-Gläsern geprüft, die mit den Stämmen Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII geimpft wurden. Der Stamm Aal V wurde sowohl vom Kaninchenantiserum als auch von den Aalsera A und B stark gehemmt, im übrigen fiel die Reaktion negativ aus. Später wurde durch Agglutination in Röhrchen der Titer der beiden Aalsera bestimmt; Serum A agglutinierte den homologen Stamm noch in einer Verdünnung von 1:20.480, Serum B in der Verdünnung 1:5.120. Über die angewendete Methodik sowie über einige bei den Agglutinationen gemachte Beobachtungen wird weiter unten näher berichtet.

Am 3. I. 1931, also 77 Tage nach der Impfung, wurde in gleicher Weise wie oben erwähnt den Aalen D, F und G sowie dem Kontrollaal H das Blut steril entnommen und die gewonnenen Sera mit Karbol versetzt. Eine Prüfung dieser Sera in mit Stamm Aal V geimpften *Wassén*-Gläsern fiel für die Sera D, F und G positiv, für Serum H negativ aus. Die Röhrchenagglutination konnte erst etwa 5 Monate später vorgenommen werden; die Sera D und F hatten beide einen Agglutinationstiter von 1:5.120, Serum G einen von 1:10.240. Das Kontrollserum H war leider nicht mehr vorhanden, mit dem Serum eines am 3. VI. eingekauften, anscheinend gesunden Aals konnte aber der Stamm Aal V nur in den Verdünnungen 1:10 und (schwach) 1:20 agglutiniert werden, was wohl auf das Vorhandensein von Normalagglutininen zurückgeführt werden muss.

Im April 1931 konnten die Versuche über die Agglutininbildung, dank der Unterstützung aus "Lennanderska Fonden", wieder aufgenommen und in grösserem Umfange angeführt werden. Leider waren zu dieser Zeit die zu erhaltenden Aale in schlechter Verfassung, wie ich anfangs glaubte weil sie kurz nach dem Winterschlaf gefangen waren, was wohl auch zum Teil

richtig war; gewisse Symptome deuteten aber auch darauf hin, dass Infektionen irgend einer Art mit im Spiel waren. Es wurden am 25. IV. 16 Aale bei einem Fischhändler eingekauft; schon während des Transports ins Laboratorium gingen aber 7 derselben ein. Mit steril entnommenem Blut aus allen diesen toten Aalen wurden Bouillonkulturen angelegt; alle Kulturen blieben steril, was darauf hinzudeuten schien, dass sie nicht an einer Bakterieninfektion gestorben und dass also die Vermutungen in dieser Richtung nicht zutreffend waren. Das Serum eines dieser Aale wurde in Wassén-Gläsern gegen die Stämme Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII geprüft, in sämtlichen Fällen mit negativem Erfolg.

Die überlebenden 9 Aale wurden für Impfversuche (A-Reihe) verwendet; nach der Impfung wurden die Versuchstiere wie früher in Glaswannen mit schwach durchfliessendem Leitungswasser im Laboratorium gehalten. Der Verlauf der Versuche gestaltete sich folgendermassen:

Aal A I. 62 cm. Am 25. IV. mit 0,3 ccm einer Aufschwemmung von Stamm Aal IV (etwa 1 Öse in 5 ccm 0,85 % NaCl-Lösung) in der Herzgegend geimpft. Bis 9. V. etwas schlapp, aber ohne äusserlich bemerkbare Reaktion. An diesem Tage eine neue Einspritzung ganz wie die vorige; bald nach der Impfung entstanden hellere, etwa 3—5 mm im Durchmesser betragende Flecke am Kopf und Vorderkörper, sowie am Schwanz, die jedoch nach einer halben Stunde zum Teil verschwunden, zum Teil undeutlicher waren; eine Stunde nach der Impfung völlig normales Aussehen. Bis 1. VI. ohne äussere Symptome; an diesem Tage (37 Tage nach der ersten Impfung) getötet, Blut steril entnommen.

Aal A II. Am 25. IV. mit 0,3 ccm derselben Aufschwemmung wie Aal A I intraperitoneal vor dem After geimpft. Am 26. IV. schlapp, helle, rotumrandete Flecke am Bauch; Analflosse und Kiefer stark rötlich. Am 27. IV. eingegangen. Grosse, weisse, rotumrandete Flecke am Bauch, der grösste um die Impfstelle herum, Unterkiefer weiss, rotumrandet, vordere $\frac{2}{3}$ der Afterflosse kirschrot, Schwanz mit undeutlichen hellen, rotumrandeten Flecken.

Aal A III. Am 25. IV. mit 0,3 ccm derselben Aufschwemmung wie Aale A I und A II subcutan am Beginn der Rückenflosse geimpft. Am 26. IV. schlapp. Am 27. IV. sehr schlapp, schwache Reaktion an der Impfstelle. Am 28. IV. nachmittags verendet. Kleiner schiefergrauer Fleck um die Impfstelle herum, ein grösserer, ähnlich aussehender Fleck von der Nackengegend nach hinten bis kurz vor Beginn der Rückenflosse.

Aal A IV. Am 25. IV. mit 0,3 ccm einer Aufschwemmung von Stamm Aal V (etwa 1 Öse in 5 ccm 0,85 % NaCl-Lösung) in der Herzgegend geimpft. Am 26. IV. schlapp. Am 27. IV. schlapp, keine äusserlich bemerkbare Reak-

tion. Am 29. IV. vormittags eingegangen, schwache rötliche Reaktion an der Impfstelle.

Aal A V. Am 25. IV. mit 0,3 ccm derselben Aufschwemmung wie Aal A IV intraperitoneal kurz vor dem After geimpft. Verlauf genau wie bei Aal A IV.

Aal A VI. Am 25. IV. mit 0,3 ccm einer Aufschwemmung von Stamm Sch I (etwa 1 Öse in 5 ccm 0,85 % NaCl-Lösung) in der Herzgegend geimpft. Am 29. IV. eingegangen ohne äussere Reaktion.

Aal A VII. 46 cm. Am 25. IV. mit 0,3 ccm derselben Aufschwemmung wie Aal A VI intraperitoneal vor dem After geimpft. Am 26. IV. schlapp. Bis 29. IV. ohne deutliche Reaktion. Am 30. IV. Hautrötung um die Impfstelle herum, die am 1. V. erheblich verstärkt, am 2. V. wieder etwas schwächer war. Am 3. V. Fleck an der Impfstelle blasser, schwarzpigmentiert. Am 9. V. eine neue Impfung, ganz wie die vorige. Bis 30. V. keine Reaktion wahrgenommen; an diesem Tage (35 Tage nach der Impfung) getötet, Blut steril entnommen. Nach dem Tode war auch an der neuen Impfstelle sowie längs der Mittellinie des Bauches eine feine Schwarzpigmentierung zu beobachten.

Aal A VIII. Am 25. IV. mit 0,3 ccm einer Aufschwemmung von Stamm Sch XVII (etwa 1 Öse in 5 ccm 0,85 % NaCl-Lösung) in der Herzgegend geimpft. Am 26. IV. schlapp. Am 27. IV. eingegangen; grosser weisser, rotumrandeter Fleck an der Impfstelle, Hautrötungen auch am Unterkiefer.

Aal A IX. 44 cm. Am 25. IV. mit 0,3 ccm derselben Aufschwemmung wie Aal A VIII intraperitoneal vor dem After geimpft. Am 9. V. eine neue Impfung, ganz wie die vorige. Verlauf sowohl vor wie nach der zweiten Impfung genau wie bei Aal VII, nur mit der Ausnahme, dass kein Pigmentstreifen längs des Bauches wahrgenommen wurde. Am 1. VI. (37 Tage nach der ersten Impfung) getötet, Blut steril entnommen.

Von den neun Aalen dieser Versuchsreihe lebten also nur drei so lange, dass ihre Sera auf Agglutinine geprüft werden konnten. Serum A I agglutinierte den homologen Stamm (Aal IV) bis zur Verdünnung 1:160, Serum A VII den homologen Stamm (Sch I) bis zu 1:320 und Serum A IX den homologen Stamm (Sch XVII) ebenfalls bis zu 1:320 (1:640?). Die entsprechende Prüfung in *Wassén*-Gläsern fiel für Serum A I negativ, für die Sera A VII und A IX positiv aus, die klare Agarzone um die Papierstreifen herum war indessen in beiden Fällen sehr schmal. Hieraus ist also zu ersehen, dass die bei dieser Reaktion zu verwendenden Sera einen Titer von wenigstens 1:320 haben müssen, um einen positiven Ausfall sicher hervorrufen zu können. Eine Prüfung in Gläsern mit Serum A VII gegen den Stamm Sch XVII und Serum A IX gegen Sch I fielen wie erwartet negativ

aus. Von einem Serum eines gesunden Aals wurden die Stämme Aal IV, Sch I und Sch XVII gar nicht beeinflusst (Anfangsverdünnung 1:10). Aus diesem Versuche ging somit hervor, dass auch mit den Stämmen Aal IV, Sch I und Sch XVII als Antigen spezifische Agglutinine gebildet wurden, auch wenn der Titer recht niedrig war; die vermutliche Ursache hierzu wird weiter unten näher diskutiert.

Mit Rücksicht auf die grossen Verluste in der eben besprochenen Versuchsreihe wurde ein Versuch gemacht, durch abermalige Injektionen inaktivierter Vibrionen in steigenden Dosen eine Agglutininbildung hervorzurufen. Es wurden Aufschwemmungen der Stämme Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII in 0,85 % NaCl-Lösung hergestellt, eine halbe Stunde lang bei + 56° C inaktiviert und im Kühlschrank aufbewahrt. Mit je 0,2 ccm dieser Aufschwemmungen wurden am 2. V. 12 Aale geimpft (B-Reihe) und zwar folgendermassen: B I intraperitoneal vor dem After, B II und B III subcutan an der Rückenflosse mit Antigen Aal IV, B IV—VI in ähnlicher Weise mit Antigen Aal V, B VII—IX mit Antigen Sch I und B X—XII mit Antigen Sch XVII. Aufbewahrung der Aale in fliessendem Leitungswasser im Laboratorium wie vorher.

Der weitere Verlauf dieser Versuchsreihe gestaltete sich folgendermassen:

Aal B I. 61 cm. Am 7., 12., 20. und 26. V. mit 0,3, 0,4, 0,5 bzw. 0,6 ccm desselben Antigens und in derselben Weise wie am 2. V. geimpft. Am 10. V. wurde die Farbe dieses Aals heller, fast kupferrostgrün, und diese Farbe behielt er während der ganzen Versuchszeit; sonst keine bemerkbare Reaktion. Am 17. VI. getötet, Blut steril entnommen.

Aal B II. Am 3. V. ohne Reaktion, aber sehr schlapp, am Nachmittag in Rückenlage. Am 4. V. abends eingegangen. Schwache Hautreaktion an der Impfstelle, Kopf blass, schwach rot umrandet.

Aal B III. 45 cm. Weitere Impfungen wie bei B I. Keine Reaktion bemerkbar. Am 18. VI. getötet, Blut steril entnommen.

Aal B IV. 50 cm. Weitere Impfungen wie bei B I aber mit dem Antigen Aal V. Keine Reaktion bemerkbar. Am 17. VI. getötet, Blut steril entnommen.

Aal B V. Am 7. und 12. V. wie Aal B IV geimpft. Ohne äussere Symptome, aber vom 12. V. an dann und wann in Rückenlage. Am 18. V. getötet, Blut steril entnommen.

Aal B VI. 49,5 cm. Weitere Impfungen wie bei B IV. Keine Reaktion bemerkbar. Am 18. VI. getötet, Blut steril entnommen.

Aal B VII. 55 cm. Am 7. V. mit 0,3 ccm der Aufschwemmung von Sch I geimpft. Sehr schlapp, am Nachmittage gestorben. Hornhaut der Augen getrübt, milchweiss, Kopf zum Teil angeschwollen, die Anschwellung grau, rotumrandet, Hautrötungen an den Kiefern und an der Unterseite des Kopfes

bis zu den rot umrandeten Kiemenöffnungen, Brustflossen stark rotgestreift, vor dem After an der Impfstelle schwache Hautrötung, Afterflosse zum Teil rotgefleckt.

Aal B VIII. Am 3. V. keine Reaktion. Am 4. V. morgens tot, Augen milchweiss, Kiefer schwach rötlich, sonst keine Symptome.

Aal B IX. 55 cm. Weitere Impfungen mit dem Antigen Sch I wie bei B I. Am 8. V. Farbe auffallend hell, am 10. V. noch heller, gelbgrün, am 14. V. noch heller als vorher. Am 16. V. beginnende Fadenpilzinfektion an der Haut. Am 20. V. Farbe wieder dunkler; hie und da reicher Belag von Schleim mit abgestossenen Epithelzellen, Bakterien und Fadenpilzen. Schleim abgestreift, Aal in frisches Wasser übergeführt. Am 21. V. anscheinend wiederhergestellt, am 22. V. aber wiederum beginnende Schleimbildung, die am 23. V. stark zugenommen hatte; wie am 20. V. behandelt. Am 26. V. bei der letzten Impfung wieder mit Schleim stark bedeckt, abgestreift, spät am Abend im Sterben begriffen. Getötet, Blut steril entnommen.

Aal B X. 50 cm. Am 3. V. keine Reaktion. Am 4. V. sehr schlapp, am Mittag in Rückenlage. Am 5. V. noch sehr schlapp, rote Streifen an den Brustflossen, an der Unterseite des Kopfes, sowie an der Afterflosse. Am 7. V. anscheinend wiederhergestellt, von nun an mit Antigen Sch XVII wie bei B I geimpft. Keine weitere äussere Reaktion während des Versuches bemerkbar. Am 17. VI. getötet, Blut steril entnommen.

Aal B XI. 52 cm. Am 3. V. sterbend, Hornhaut der Augen undurchsichtig, milchweiss, grosser weisser, rotumrandeter Fleck, der sich über die Leber- und Herzgegend, vor den Brustflossen und über die Oberseite des Kopfes erstreckt, ähnlicher Fleck am Bauche kurz vor dem After, vordere $\frac{3}{4}$ der Afterflosse stark rötlich mit 4 grossen weissen Flecken, Schwanzspitze abwechselnd mit grauen und rötlichen Flecken bedeckt. Bouillonkultur mit steril genommenem Herzblut angelegt, blieb steril.

Aal B XII. 48 cm. Am 7., 12. und 20. V. wie die übrigen geimpft, bis 23. V. ohne äussere Reaktion. Am 24. V. Haut an der Impfstelle blasenförmig erhaben. Am 25. V. sehr unruhig die Haut über der "Blase" zum Teil abgefallen, zwei seichte rötliche Löcher vom 5×3 mm bzw. 1×1 mm freilassend. Getötet, Blut steril entnommen.

Aus dieser Versuchsreihe wurden also nicht weniger als 8 Sera erhalten, die auf das ev. Vorkommen von Agglutininen geprüft werden konnten; von dem schon 5 Tage nach der ersten Impfung verendeten Aal B VII konnte nicht so viel Blut erhalten werden, dass das Serum für Agglutinationen in Röhren ausreichte. Mit dem spärlichen Blutmaterial wurden sterile Fliesspapierstreifen angefeuchtet und in *Wassén*-Gläsern gegen die Stämme Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII geprüft, in sämtlichen Fällen mit negativem

Erfolg. Die Röhrenagglutinationen der übrigen Sera ergaben folgende Resultate: Das 16 Tage alte (d. h. 16 Tage nach der ersten Impfung gewonnene) Serum B V agglutinierte den homologen Stamm nur in den Verdünnungen 1:10 und 1:20 deutlich, und dasselbe war mit dem 23 Tage alten Serum B XII der Fall, während das 24 Tage alte Serum B IX den homologen Stamm noch in der Verdünnung 1:80 eine schwache aber deutlich wahrnehmbare Agglutination hervorrief. Die entsprechenden Prüfungen in *Wassén*-Gläsern fielen alle negativ aus. Die übrigen 5 Sera, alle 46—47 Tage alt, verhielten sich folgendermassen: Sera B I und B III agglutinierten den homologen Stamm Aal IV bis zu den Verdünnungen 1:160 bzw. 1:320 und die Prüfung in halbfestem Agar fiel für B I sehr schwach, für B III recht stark positiv aus. Sera B IV und B VI agglutinierten den homologen Stamm Aal V bis zu den Verdünnungen 1:10.240 bzw. 1:2.560 und Serum B X den homologen Stamm Sch XVII bis zur Verdünnung 1:1.280. Auch wenn wir von den Ergebnissen mit den Sera B V, B XII, und B IX absehen, bei welchen die gefundene Agglutination, wenigstens in den zwei ersten Fällen, wohl ebenso gut auf vorhandene Normalagglutinine zurückgeführt werden kann, so scheint aus den Versuchen dieser Reihe hervorzugehen, dass auch inaktivierte Vibrionen die Fähigkeit besitzen, eine Agglutininbildung hervorzurufen. Ob die verschieden hohen Werte der benutzten Stämme auf verschiedenartige antigene Wirkung oder auf individuelle Schwankungen der agglutininbildenden Fähigkeit der einzelnen Versuchstiere zurückzuführen war, ist natürlich schwer zu entscheiden. Es ist sogar, wie wir bald finden werden, auch eine dritte Möglichkeit denkbar.

Es müssen noch einige Einzelheiten bezüglich dieser Versuchsreihe kurz besprochen werden. Das Serum B X wurde in halbfestem Agar nicht nur gegen den homologen Stamm Sch XVII, sondern auch gegen die Stämme Aal IV, Aal V und Sch I geprüft und zeigte sich dabei auffallenderweise fast ebenso stark positiv gegenüber Aal V wie gegenüber Sch XVII. In Röhren wurde der Stamm Aal V bis zur Verdünnung 1:320 agglutiniert. Da mit dem Stamm Aal V als Antigen weder bei Kaninchen noch bei Aalen Agglutinine gegen den Stamm Sch XVII gebildet wurden, schien das Ergebnis mit dem Serum B X rätselhaft; später wurde festgestellt, dass ein durch Behandlung mit dem Stamm Sch XVII erhaltenes Kaninchenantiserum nicht imstande war, den Stamm Aal V in stärkerer Verdünnung als 1:10 zu agglutinieren. Um zu erfahren, ob sich die Aale in dieser Hinsicht andersartig verhielten, wurden zwei Aale folgendermassen behandelt:

Aal F I. 60 cm. Am 29. X., 3., 8., 14. und 19. XI. 1932 mit je 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 und 0,6 ccm einer bei +56° C 1/2 Stunde inaktivierten kräftigen Aufschwemmung des Stammes Sch XVII subcutan an der Rückenflosse geimpft.

In fließendem Leitungswasser gehalten; Temperatur desselben am 29. X. + 12,5° C, am 2. XI. + 11,5°, am 3. XI. + 11°, am 7. XI. + 8,5°, am 12. XI. + 8,5° und am 28. XII. + 7° C. Keine äussere Reaktion, nur am Tage nach der dritten Impfung sehr kleiner heller Fleck an der Impfstelle. Am 28. XII., also 60 Tage nach der ersten Impfung, getötet, Blut steril entnommen.

Aal F II. 72 cm. Am 29. X. mit 0,2 ccm einer Aufschwemmung des Stammes Sch XVII (etwa 1 Öse in 5 ccm 0,85 % NaCl-Lösung) in der Herzgegend impft. In fließendem Wasser wie F I. Bis 6. XI. ohne Reaktion. Am 7. XI. sehr kleine Erhebung an der Impfstelle. Am 8. XI. schlapp. Am 12. XI. Erhebung zurückgegangen; eine abermalige Impfung wie am 29. XI., aber mit 0,4 ccm der Aufschwemmung. Bis 28. XII. ohne äussere Reaktion; an diesem Tage, 60 Tage nach der ersten Impfung, getötet, Blut steril entnommen. Pericard etwas rötlich, wie schwach entzündet, sonst auch keine inneren Symptome.

Bei der Prüfung konnte der homologe Stamm Sch XVII vom Serum F I nur bis zur Verdünnung 1:40, vom Serum F II bis 1:80 agglutiniert werden; Stamm Aal V wurde vom Serum F I gar nicht agglutiniert, mit Serum F II wurde nur in der Verdünnung 1:10 eine schwache Andeutung einer Flockung bemerkt. Obwohl die Agglutininbildung in diesem Falle eine nur sehr schwache war, scheint sie doch in keiner Weise die Annahme zu stützen, dass mit dem Stamm Sch XVII als Antigen bei Aalen Agglutinine auch gegen den Stamm Aal V gebildet werden.

Es scheinen mir deshalb die Agglutinationsergebnisse mit dem Serum B X nur in der Weise gedeutet werden zu können, dass der Aal B X vor dem Beginn des Versuches mit Vibrionen, und zwar vom Agglutinationstypus Aal V, infiziert war; hiemit stimmen ja auch die für das Versuchstier B X am 5. V. beobachteten, rotseucheähnlichen Symptome (vgl. oben) sehr gut überein. Auch bei vielen anderen Versuchstieren der B-Reihe wurden ja ähnliche Symptome beobachtet, aus welchem Grunde von dem am Tage nach der ersten Impfung verendeten Aal B IX Kulturen angelegt wurden, die aber negativ ausfielen. In Kulturen mit Material aus einem gleichzeitig mit den Versuchstieren eingekauften Aal, der des schlechten Zustandes und der rotseucheähnlichen Symptome wegen nicht für die Versuche verwendet wurde, wuchsen sowohl bewegliche als auch unbewegliche Stäbchen, aber keine Vibrionen hervor. Trotz des negativen Ausfalles dieser wie auch der im Zusammenhang mit der A-Reihe gemachten, oben erwähnten Abimpfungen, die ja ebenfalls negativ ausfielen, habe ich nachträglich die Sera A I, A VII, B I, B III, B IV, B VI und B IX mittels Röhrenagglutination gegen die heterologen Stämme geprüft (Serum B VII erwies sich ja, wie schon oben bemerkt, bei Agglutinationsversuchen in *Wassén*-Gläsern als negativ für alle

vier Stämme). In sämtlichen Fällen, mit einer Ausnahme, fielen auch diese Prüfungen negativ aus (Anfangsverdünnung bei allen 1:40). Die Ausnahme bezieht sich auf Serum A VII, das den Stamm Aal V in Verdünnungen bis 1:2.560 agglutinierte. Da die betreffenden Aale angeblich an der Küste in der Nähe von Göteborg gefangen waren, so muss wohl aus den Fällen A VII und B X geschlossen werden, dass *V. anguillarum* im Agglutinationstypus Aal V auch an der Westküste Schwedens vorkommt oder wenigstens im Frühjahr 1931 vorkam.

Es wäre dann auch denkbar, dass die höheren Agglutinationswerte der Sera B IV und B VI nicht durch das eingespritzte Antigen allein hervorgerufen wurden. Spätere Versuche zeigten aber, dass inaktivierte Vibrionen auch in Fällen, wo eine gleichzeitige Spontaninfektion ausgeschlossen war, einen hohen Agglutinationstiter bewirken können, was ja die mit den Sera B IV und B VI erhaltenen Ergebnisse glaubwürdig machen, und zwar besonders deshalb, weil die entsprechenden Aale während der ganzen Versuchszeit keine rotseucheähnlichen Symptome aufwiesen.

Es wurden im Laboratorium zu Göteborg noch einige Versuche angestellt, die hier angeführt werden, weil gewisse Einzelheiten derselben, sowohl hinsichtlich der Beurteilung der Pathogenität, als auch in bezug auf die Agglutininbildung von Interesse sind.

Am 3. VI. 1931 wurde ein Versuch (C-Reihe) mit Einimpfung von lebenden Vibrionen des Stammes Aal V (etwa 1 Öse einer Schrägagarkultur in 5 ccm 0,85 % NaCl-Lösung) an sechs Aalen angestellt. Alle wurden in fließendem Leitungswasser im Laboratorium gehalten.

Aal C I. Am 3. VI. mit 0,2 ccm der Aufschwemmung in der Herzgegend geimpft. Am 4. VI. keine Reaktion, am 8. VI. schlapp; Haut an der Ventralseite schwach, Afterflosse stark rötlich gefärbt. Am 10. VI. eingegangen, Symptome wie früher, aber verstärkt. Keine Blutentnahme.

Aal C II. 59 cm. Am 3. VI. wie C I geimpft. Bis 17. VI. ohne Reaktion; an diesem Tage eine zweite Impfung wie früher, aber mit 0,4 ccm der Aufschwemmung. Am 18. VI. keine Reaktion. Am 20. VI. schlapp, Hautrötung in der Herzgegend und um die Kiemenöffnungen. Zwischen 22. VI. und 24. VII. keine Beobachtungen. Am 24. VII. an der Impfstelle eine Wunde in Heilung begriffen, die bei der Alkoholwaschung vor der sterilen Blutentnahme aufbrach; umgebende Muskulatur rötlich.

Aal C III. 61 cm. Am 3. VI. mit 0,2 ccm der Aufschwemmung intraperitoneal vor dem After geimpft. Bis 15. VI. ohne Reaktion. Am 16. VI. Hautrötung an der Impfstelle. Am 17. VI. eine zweite Impfung wie früher, aber mit 0,4 ccm der Aufschwemmung. Am 18. VI. keine Reaktion an der Impf-

stelle. Am 20. VI. etwas schlapp, schwache Hautrötung an der Impfstelle. — — — Am 24. VII. keine Reaktion an der Impfstelle. Blut steril entnommen.

Aal C IV. Am 3. VI. wie C III geimpft. Bis 16. VI. ohne Reaktion. Von da an immer schlapper werdend, mit stellenweiser Schleimabsonderung, später durch graue Flecke wie gebändert. Am 22. VI. eingegangen, Symptome wie vorher, aber verstärkt, blutiger Schleim aus den Kiemenöffnungen herausfliessend. Symptome also nicht rotseucheähnlich. Konnte leider nicht näher untersucht werden, vgl. aber unter C V.

Aal C V. Am 3. VI. mit 0,2 ccm der Aufschwemmung subcutan an der Rückenflosse geimpft. Bis 12. VI. ohne Reaktion. Am 16. VI. eingegangen, Symptome genau wie für C IV oben beschrieben. Blut steril entnommen. Kulturen mit Herzblut sowie mit Material aus der die Kiemenöffnungen umgebenden, rötlichen Muskulatur auf Agarplatten und in Bouillon; überall gutes Wachstum, aber nur Stäbchen, keine Vibrionen. Aale C IV und C V also im Gegensatz zu C I wahrscheinlich durch sekundäre Infektion verendet.

Aal C VI. 59 cm. Am 3. VI. wie C V geimpft. Bis 17. VI. ohne Reaktion; an diesem Tage eine zweite Impfung wie früher, aber mit 0,4 ccm der Aufschwemmung. Am 18. VI. keine Reaktion an der Impfstelle. Am 20. VI. starke Reaktion an der Impfstelle in Form einer grösseren Blutung an einer Strecke von 2 cm längs der Basis der Rückenflosse. Farbe viel heller als vorher, am Abend hell grüngelb! Am 21. VI. sehr hell gefärbt, Haut über der Impfstelle noch heller, etwas aufgehoben, rote Streifen von der Impfstelle ausgehend, und zwar besonders längs der Rückenflosse. — — — Am 24. VII. fortwährend heller als bei Beginn des Versuches, dunkle Flecke (Narben?) an der Impfstelle und auf der Rückenflosse etwas weiter nach hinten. Blut steril entnommen.

Es wurden also durch diesen Versuch vier Sera erhalten, die auf Agglutinine geprüft werden konnten. Serum C V, schon 13 Tage nach der Impfung gewonnen, hatte einen Agglutinationstiter von 1:80 (Spuren auch in 1:160 und ? 1:320). von den übrigen Sera, 51 Tage nach Beginn des Versuches entnommen und erst 3½ Monate nachher geprüft, hatten C III und C VI einen Agglutinationstiter von 1:5.120 bzw. 1:10.240, während Serum C II den homologen Stamm noch in der Verdünnung 1:81.920 deutlich agglutinierte!

Im November 1931 wurden endlich folgende zwei Versuche angestellt:

Aale D I, 61 cm und *D II*, 57 cm. Am 4., 9. und 14. XI. mit je 0,2, 0,3 und 0,4 ccm einer Aufschwemmung des Stammes Aal V (etwa 1 Öse in 5 ccm entsprechend) bei +56° C während 30 Minuten inaktiviert, subcutan an der Rückenflosse geimpft. In fließendem Leitungswasser im Laboratorium ge-

halten. Keine nennenswerte Reaktion. Am 18. XI., also 14 Tage nach der ersten Impfung getötet, Blut steril entnommen. Bei der Agglutinationsprüfung keine deutliche Agglutination, auch nicht in der Verdünnung 1:10.

Aal E I. 60 cm. Am 5. XI. mit 0,2 ccm einer nicht inaktivierten Aufschwemmung des Stammes Aal V (1 Öse in 5 ccm NaCl-Lösung) subcutan an der Rückenflosse geimpft. Wie die D-Aale gehalten. Am 6. XI. an Sauerstoffmangel gestorben (keine Wasserzufuhr während der Nacht!). Grosser, heller, etwas erhabener Fleck an der Impfstelle.

Aal E II. Am 5. XI. wie E I geimpft und in derselben Glaswanne gehalten. Am 6. XI. wegen der Unterbrechung der Wasserzufuhr stark heruntergekommen, erholte sich aber wieder rasch. Reaktion wie bei E I. Am 8. XI. an der Impfstelle ein 5 cm langer Entzündungsherd, von helleren und dunkleren, zum Teil rotgestreiften Flecken umgeben. Am 9. XI. die Entzündungsherde zentral gelblich, peripher rotblau; Aal noch recht munter. Am 10. XI. Haut an den Rändern der gelblichen Partie abfallend, an diesen Stellen Blutungen. Am 13. XI. Haut von der Impfstelle abgefallen, Rand der Wunde als rötlicher Wulst hervortretend. Aal sehr schlapp. Am 14. XI. fortschreitende Nekrotisierung des Wundrandes. Am 16. XI., also 16 Tage nach der Impfung eingegangen. Blut steril entnommen. Agglutinationstiter 1:40.

Mit Rücksicht auf die Agglutininbildung sagen diese Versuche also recht wenig, scheinen aber zu beweisen, dass die Virulenz des Stammes Aal V nach 14 Monate langer Züchtung auf Schrägagar nicht wesentlich vermindert worden war.

Die jetzt durchgangenen Versuche hatten also gezeigt, dass mit Vibrionen geimpfte Aale Agglutinine bilden, und zwar gleichgültig ob lebende oder inaktivierte Vibrionen als Antigen benützt wurden. Sie zeigten aber auch, dass diese Agglutininbildung, im Gegensatz zu den Angaben bei *Babes* und *Riegler* (1903) und *Aaser* (1925), recht langsam vor sich geht; so war z. B. der Agglutinationstiter des 23 Tage nach der ersten Impfung entnommenen Serums B XII nur 1:20, während das mit demselben Antigen hergestellte Serum B X, 46 Tage nach der ersten Impfung gewonnen, einen Titer von 1:1.280 hatte u. s. w. Mit Rücksicht auf Ergebnisse bei anderen Kaltblütern (Fröschen, vgl. *Widal* und *Sicard* 1897) war aber zu vermuten, dass verschiedene Temperaturen hierbei einen ausschlaggebenden Einfluss ausüben konnten. Bei den schon erwähnten Versuchen wurden leider keine Temperaturmessungen ausgeführt; die Temperatur hielt sich wohl aber um +12 bis +15° C, in den Sommermonaten vielleicht etwas höher, in den Wintermonaten etwas niedriger. Wäre diese Annahme richtig, dann könnte man ja eine Erklärung der Umstände erhalten, dass die Agglutininbildung der im Herbst vorgenommenen Versuche (D-, E- und F-Reihen) viel schlechter war als

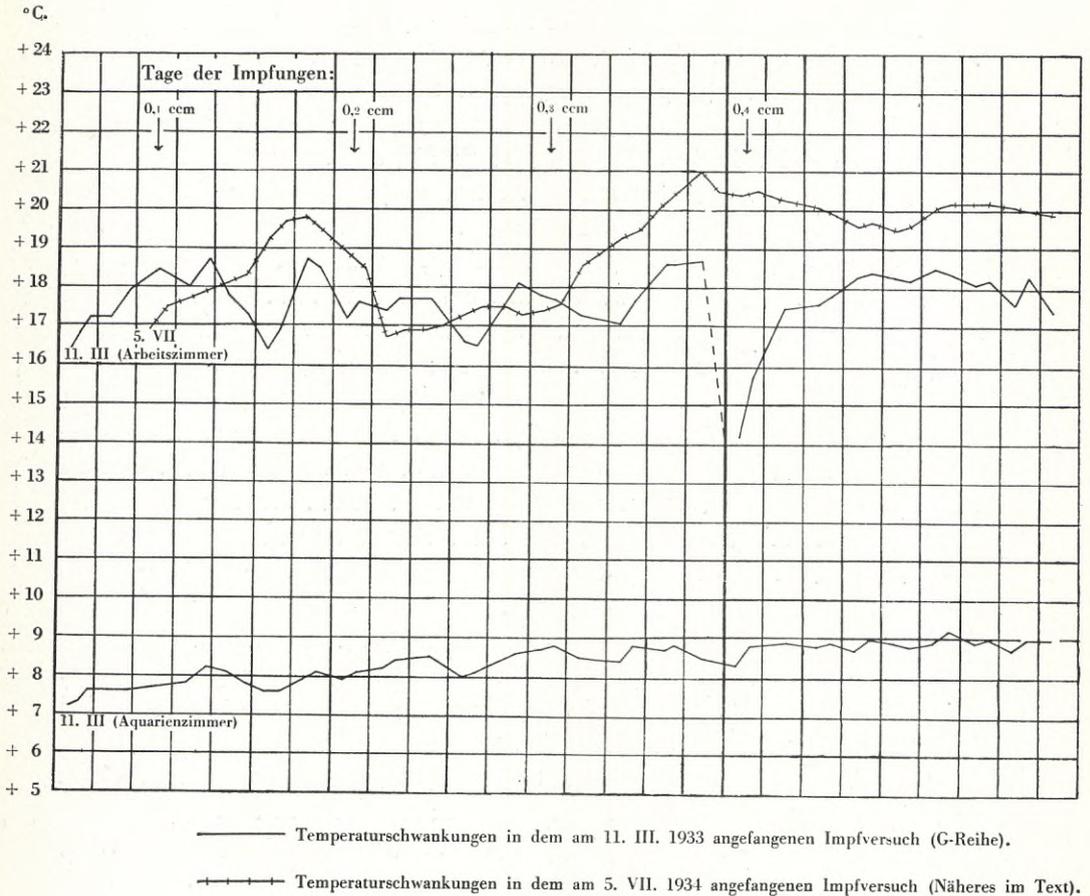


Fig. 1.

z. B. bei dem im Sommer angestellten Versuch (C-Reihe). Es war aber im Bakt. Laboratorium zu Göteborg kaum möglich, Aquarien mit verschiedenen, ziemlich konstant gehaltenen Temperaturen einzurichten.

Erst als im Spätherbst 1932 die neue Fischereiversuchsanstalt bei Drottningholm fertiggestellt wurde, konnten Impfversuche mit bei verschiedenen Temperaturen gehaltenen Aalen angestellt werden. Die Versuchsanordnung war dabei die folgende. Am 10. III. 1933 wurden je vier anscheinend völlig gesunde Aale in zwei Glaswannen mit Leitungswasser und Durchlüftung eingesetzt; die eine Wanne (mit den Aalen G I, 41 cm, G II, 54,5 cm, G III, 44,5 cm und G IV, 43,5 cm) wurde im Arbeitszimmer, die andere (mit den Aalen G V, 47 cm, G VI, 43 cm, G VII, aus Versehen nicht gemessen, und

G VIII, 57 cm) im Aquarienzimmer aufgestellt, und Temperaturablesungen wurden in der Regel zweimal täglich vorgenommen; die Temperaturschwankungen sind in Fig. 1 graphisch dargestellt. Sämtliche Aale wurden am 13., 18., 23. und 28. III. mit je 0,1, 0,2, 0,3 und 0,4 ccm einer Aufschwemmung des Stammes Aal V in 0,85 % NaCl-Lösung, die, um Verluste zu vermeiden, eine halbe Stunde bei + 56° C inaktiviert wurde, subcutan an der Rückenflosse geimpft. Mit Ausnahme der Aale G VII und G VIII blieben alle Versuchstiere völlig gesund; die genannten Aale, an welchen am 10. III. eine Herzpunktion vorgenommen wurde, waren aber am 1. IV. recht stark mit Saprolegnien bewachsen und wurden deshalb während 25 Minuten in einer 2,5 % NaCl-Lösung gebadet; G VII zeigte einen roten Fleck zwischen den Unterkieferschenkeln, G VIII eine Hautrötung in der Herzgegend. Am 2. IV., also 20 Tage nach der ersten Impfung, war der Aal G I aus der Wanne gesprungen und lag tot auf dem Fussboden und G VII war gestorben. Beiden Aalen wurde das Blut steril entnommen. Am 3. IV. wurden G II und G VIII, am 4. IV. die Aale G III, G IV, G V und G VI getötet und das Blut steril entnommen. Aus sämtlichen Aalen wurden auch Kulturen mit Material aus dem Blute und dem Darm angelegt. In keinem Falle konnten Vibrionen nachgewiesen werden, die Kulturen mit Blut aus G VII und G VIII wiesen einen reichlichen Wuchs von Stäbchen, vor allem des *fluorescens*-Typus, auf. Es scheint mir deshalb wahrscheinlich, dass die genannten Aale an einer bei der Herzpunktion erhaltenen *fluorescens*-Infektion litten.

Bei der Agglutination hatten die Sera G I, G II, G III und G IV einen Agglutinationstiter von 1:20.480, 1:10.240, 1:10.240 bzw. 1:40.960, während die Agglutinationen mit den Sera G V, G VI (Anfangsverdünnung 1:20), G VII und G VIII (Anfangsverdünnung 1:40) negativ ausfielen.

Aus diesem Versuch ist also herauszulesen, dass, wie erwartet, die Agglutininbildung bei Fischen von der Temperatur stark abhängig ist, und zwar so, dass sie von einer höheren Temperatur sehr begünstigt wird und schneller vor sich geht.

Um zu erfahren, ob auch andere Fische als Aale gegen die Aalvibrionen Agglutinine bilden können, wurden zwei Schleien mit inaktivierten Vibrionen des Stammes Aal V (etwa 2—3 Milliarden pro ccm) in ganz derselben Weise wie die eben geschilderten Aale der G-Reihe subcutan an der Rückenflosse geimpft. Da zur Zeit des Versuches (er wurde am 5. VII. 1934 begonnen) das Leitungswasser etwa dieselbe Temperatur wie die höhere Temperatur im vorigen Falle hatte (vgl. Kurve Fig. 1), konnten sie in einem Aquarium mit fliessendem Wasser gehalten werden. Es wurde keine Reaktion nach den Impfungen beobachtet, und die Tiere blieben auch sonst anscheinend völlig gesund. 22 Tage nach der ersten Impfung wurden die Tiere getötet und das

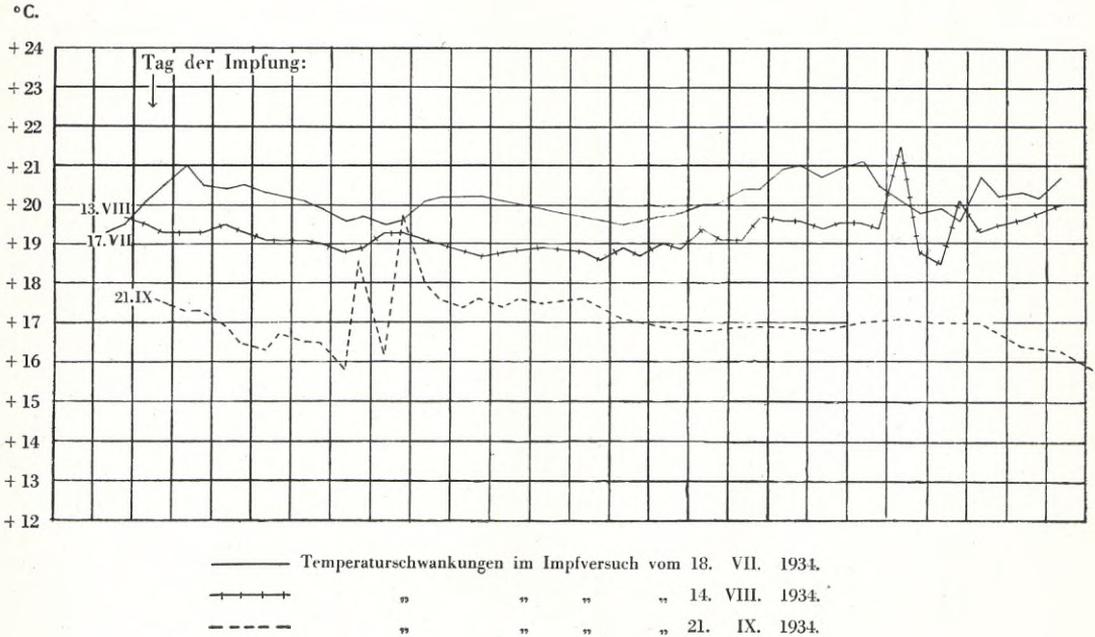


Fig. 2.

Blut steril entnommen; die Sera zeigten einen Agglutinationstiter von 1:40.960 bzw. 1:20.480. Es fand also auch hier eine Agglutininbildung statt, deren Ergebnisse jenen bei den G-Aalen völlig entsprachen. Als Kontrolle wurden Agglutinationsprüfungen mit Sera aus drei aus demselben Gewässer (Mälarsee) stammenden Schleien vorgenommen (Anfangsverdünnung 1:40); alle fielen negativ aus.

Da es ferner von Interesse war, zu prüfen, ob schon eine einmalige Impfung mit inaktivierten Vibrionen genüge, um einen hohen Agglutinationstiter hervorzurufen, wurden am 18.VII. ein Aal und eine Schleie mit je 0,5 ccm des selben Antigens wie im vorigen Falle subcutan an der Rückenflosse geimpft; die Temperatur (vgl. Kurve Fig. 2) lag in diesem Falle zwar unbedeutend höher, der Unterschied scheint mir indessen nicht grösser zu sein, als dass die Versuche direkt mit einander verglichen werden können. Der Aal erkrankte aus unbekannter Ursache und wurde 7 Tage nach der Impfung getötet; keine Agglutination des homologen Stammes, auch nicht in der Verdünnung 1:20. Also auch nicht bei dieser Temperatur, bei welcher in der G-Reihe nach 20—22 Tagen hohe Agglutinationswerte erzielt wurden, hatte die Agglutininbildung nach 7 Tagen angefangen!

Die Schleie wurde nach 23 Tagen getötet; das Serum agglutinierte den homologen Stamm deutlich in der Verdünnung 1:81.920, Spuren noch in

1:163.840. Hierauf wurden am 14. VIII. mit demselben Antigen und in derselben Weise, aber nur mit je 0,1 ccm, ein Aal (Gewicht 380 g), drei Schleien (Gew. 240, 230 bzw. 153 g) und zwei Barsche (Gew. 87 bzw. 55 g) geimpft, bei etwa derselben Temperatur gehalten (vgl. Kurve Fig. 2) und nach 23 Tagen getötet. Der Agglutinationstiter der gewonnenen Sera betrug für den Aal 1:640, für die Schleien 1:20.480 bzw. 1:5.120 und 1:2.560 und für beide Barsche 1:5.120. Es scheint somit, dass schon eine einmalige Einimpfung von nur 0,1 ccm eines inaktivierten Antigens von angegebener Stärke genügt, um ein hochwertiges agglutinierendes Serum hervorzurufen, wenigstens wenn das Gewicht der Impftiere unter etwa 250 g liegt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden drei kleinere Quappen (Gew. 75 bzw. 65 und 53 g) sowie, als Kontrolle, eine Schleie (Gew. 90 g) mit je 0,1 ccm einer inaktivierten Aufschwemmung des Stammes Aal V subcutan an der Rückenflosse geimpft und nach 24 Tagen getötet; die Temperaturschwankungen während des Versuches sind in Fig. 2 graphisch dargestellt. Der Titer betrug für die drei Quappenserum nur 1:320, 1:320 bzw. 1:160, war aber auch für die Schleie verhältnismässig niedrig, 1:640, was alles wohl mit der niedrigeren Temperatur dieser Versuchsreihe zusammenhängt. Der Versuch scheint mir jedoch zu beweisen, dass auch Quappen gegen diese Vibrionen Agglutinine bilden können. Alle vier Sera bewirkten bei der Prüfung in halbfestem Agar einen positiven Ausfall gegen dem Stamm Aal V, und zwar das Schleisenserum am stärksten, das zuletzt erwähnte Quappenserum am schwächsten; es liegt somit hier eine weitere Stütze dafür vor, dass schon Sera mit einem Titer von nur 1:160 zuweilen bei dieser Art der Agglutinationsprüfung brauchbar sein können. Röhrenagglutinationen mit den drei Quappenserum (Anfangsverdünnung 1:40) und den Stämmen Aal IV, Sch I und Sch XVII als Antigen fielen vollkommen negativ aus; auch diese Sera erwiesen sich also als streng spezifisch. Hierzu ist endlich zu bemerken, dass mit Normalserum aus drei Barschen und vier Quappen (alle ebenfalls aus dem Mälarsee stammend) keine Agglutination des Stammes Aal V erzielt werden konnte (Anfangsverdünnung 1:20).

Obwohl es eigentlich über den Rahmen dieser Untersuchung über *V. anguillarum* hinausgeht, mag ein Impfversuch mit einer anderen Bakterienart mitgeteilt werden. Zwecks Prüfung der Pathogenität wurden zwei Barsche mit je etwa 0,1 ccm einer Aufschwemmung in 0,85 % NaCl eines *fluorescens*-Stammes geimpft; da sie nach 10 Tagen noch munter waren und keine Reaktion zeigten, wurden sie in gleicher Weise wie früher, aber jetzt mit je 0,3 ccm einer frischbereiteten Aufschwemmung desselben Stammes geimpft. Beide blieben gesund und wurden nach 38 Tagen getötet. Temperatur

während des Versuches etwa zwischen $+17$ und $+21^{\circ}$ C schwankend. Der Agglutinationstiter der gewonnenen Sera betrug 1:2.560 bzw. 1:640 (1:1.280?).

Durch die hier mitgeteilten Versuche sind natürlich die Fragen über die Agglutininbildung bei Fischen bei weitem nicht erschöpft; ich hoffe jedoch, dass sie einige Punkte aufgeklärt haben. Die Ergebnisse können folgendermassen zusammengefasst werden:

1) *Fische (Aal, Schleie, Barsch, Quappe) reagieren gegen Einspritzung von Bakterien verschiedener Arten (V. anguillarum, B. fluorescens) durch Bildung von Agglutininen.*

2) *Die agglutinierenden Sera sind meistens hochwertig und scheinen ebenso streng spezifisch zu sein wie z. B. Kaninchen-Antisera.*

3) *Als Antigen können sowohl lebende, als auch inaktivierte Bakterien benutzt werden.*

4) *Die Agglutininbildung ist von der Wassertemperatur stark abhängig, und zwar so, dass sie bei höherer Temperatur viel schneller vor sich geht.*

Zuletzt noch etwas über einige bei den Röhrenagglutinationen gemachte Beobachtungen.

Schon *Bergman* (1911) hat hinsichtlich der Agglutinationstechnik folgendes bemerkt:

''Zu den folgenden Versuchen wurden Aufschwemmungen in physiologischer Kochsalzlösung drei Tage alter Agarkulturen, bei Zimmertemperatur gewachsen, verwendet.

Um einigermaßen entscheiden zu können, eine wie lange Beobachtungszeit erforderlich war, wurden zwei Reihen von Verdünnungen des Serums gemacht, das den höchsten Titer hatte, das homologe Antigen wurde hinzugesetzt und die Reihen wurden, die eine im Zimmer (18°), die andere im Thermostat (37°) aufgestellt und nach gewissen Zwischenzeiten beobachtet. Es zeigte sich dann, dass bei 37° die Reaktion schon nach $2\frac{1}{4}$ Std. abgeschlossen war, bei 18° aber erst nach 3 Std. In den Hauptversuchen standen die Proben $2\frac{1}{4}$ Std. im Thermostat, wonach sie herausgenommen und abgelesen wurden. Danach wurden sie bei Zimmertemperatur bis zum folgenden Tage aufbewahrt, da sie aufs Neue beobachtet wurden. Irgend eine Änderung der Resultate trat nicht ein.'' (Von mir übersetzt.)

Bei meinen eigenen Agglutinationsversuchen benutzte ich zuerst Aufschwemmungen in 0,85 % NaCl-Lösung von 24-stündigen Schrägagarkulturen; auch die Serumverdünnungen wurden mit NaCl-Lösung derselben Konzentration hergestellt. Die ersten, mit Kaninchenantiserum vorgenommenen Agglutinationen wurden bei $+37^{\circ}$ C gehalten. Als ich aber mit

Aalsera zu arbeiten begann, wurden zuerst auch Parallelversuche bei Zimmertemperatur (+ 18 bis + 20° C) gemacht, indem ich von dem Gedanken ausging, dass Agglutinine, die nur bei 37° wirksam wären, den Aalen nicht zu Nutzen sein könnten (die eben angeführten Versuche *Bergmans* waren mir damals unbekannt). Es zeigte sich denn, dass die Reaktion bei Zimmertemperatur meistens schneller verlief als bei 37°. Um zu erfahren, ob diese Erscheinung mit den Temperaturen der agglutininbildenden Tiere im Zusammenhange stehen könnte, ob also die von Warmblütern gebildeten Agglutinine bei 37°, die der Kaltblüter bei niedriger Temperatur wirksamer waren, wurden Parallelversuche auch mit Kaninchensera gemacht; in diesen Fällen verlief aber die Reaktion meistens ebenso schnell bei Zimmertemperatur wie bei 37°, in einigen Fällen sogar schneller bei Zimmertemperatur. Diese Ergebnisse haben mich zu dem Gedanken geführt, dass die optimale Temperatur für die Agglutination nicht durch diejenige des agglutininbildenden Tieres, sondern durch die des zu agglutinierenden Bakteriums bedingt ist. Aus diesem Grunde wurden später alle Agglutinationsversuche bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Bei den Agglutinationen mit den Aalsera trat indessen eine andere Erscheinung auf, die mir zuerst rätselhaft erschien. Eine Agglutination mit Serum des Aals A und einer Aufschwemmung des Stammes Aal V (Zimmertemp.) zeigte nach 1 Stunde wie auch nach 4 Stunden deutliche Flockung noch in der Verdünnung 1:20.480, nach 24 Stunden aber nur bis 1:2.560; mit dem Serum Aal B waren die entsprechenden Werte bei Zimmertemperatur 1:2.560, 1:5.120 und 1:1.280, bei 37° 1:2.560, 1:2.560 und 1:640! Um zu prüfen, ob die gleichmässige Trübung in jenen Röhrechen, in welchen nach 1 bzw. 4 Stunden die Flockung deutlich war, durch Verunreinigungen bewirkt sein könnte, wurde Material aus diesen Röhrechen auf Agarplatten gestrichen; es wuchsen indessen ausschliesslich Vibrionenkolonien hervor. Da bekanntlich die Agglutination nur bei Anwesenheit von Kochsalz stattfindet, und die Aalvibrionen an einen verhältnismässig hohen Salzgehalt angepasst sind (vgl. oben p. 17 ff.), lag der Gedanke nahe, dass der Salzgehalt der verwendeten 0,85 % NaCl-Lösung nicht ausreiche, um ein dauerndes Zusammenflocken der Vibrionen zu bewirken. Es wurden deshalb für weitere Agglutinationsversuche sowohl die Aufschwemmungen des Antigens, als auch die Serumverdünnungen mit einer 2 % NaCl-Lösung hergestellt, und hiedurch wurde auch in der Tat jede Auflösung einer einst eingetretenen Flockung verhindert. Es scheint mir also, als ob wir es auch in diesem Falle mit der Tatsache zu tun hätten, dass die Agglutination bei den optimalen Bedingungen der zu agglutinierenden Bakterienart am besten vor sich geht. Als eine weitere Stütze dieser Annahme kann wohl die Beobachtung angeführt werden, dass

sich die in Rede stehenden Vibriostämme nach jahrelanger Züchtung auf Schrägagar mit gewöhnlichem Salzgehalt, die ja ein Herabsetzen der Lebensmöglichkeiten in höheren Salzkonzentrationen bewirkte (vgl. oben p. 18), nunmehr in 0,85 % NaCl-Lösung agglutinieren lassen, ohne dass es dabei zu einem Rückgang einer einst eingetretenen Flockung kommt. Andererseits trat diese Erscheinung, und zwar im Kaninchenantiserum wieder auf bei den jüngst geprüften Stämmen H I, H II, Sch 6, 10, 16 und 24, von welchen wenigstens die Sch-Stämme auf Agar mit erhöhtem Salzgehalt (vgl. *Schäperclaus* 1934, p. 215) weitergezüchtet wurden.

Aus den oben angeführten Tatsachen scheint mir also folgende Schlussfolgerung möglich oder wenigstens denkbar: die Tatsache, dass die Agglutination der für Warmblüter pathogenen Bakterien am besten in physiologischer Kochsalzlösung bei + 37 °C vor sich geht, ist nur ein Spezialfall des allgemeineren Gesetzes, dass die optimalen Bedingungen der Agglutination mit den optimalen Bedingungen des zu agglutinierenden Bakteriums zusammenfallen. Inwieweit diese Betrachtungsweise Gemeingültigkeit besitzt, kann natürlich erst durch weitere Untersuchungen an umfangreichem Material festgestellt werden.

III. Allgemeine Schlussfolgerungen.

1. *In welcher Ausdehnung ist die Agglutinationsmethode als diagnostisches Hilfsmittel verwendbar?*

Die Agglutinationsprüfung hat bekanntlich in der bakteriologischen Diagnostik als spezifisches Diagnosticum grosse und allgemeine Verwendung gefunden. Es ist aber von verschiedenen Autoren der Wert der Agglutination als diagnostische Methode in Zweifel gezogen worden (vgl. z. B. *Schäperclaus* 1930, p. 364), und es muss natürlich zugegeben werden, dass sie in gewissen Fällen überschätzt und allzu einseitig benützt wurde. In dem Falle aber, wo sich Bakterienstämme, deren Kultureigenschaften übereinstimmend sind, auch in agglutinatorischer Hinsicht gleichartig verhalten, ist wohl an ihrer Identität nicht zu zweifeln. Um ein Beispiel aus den uns jetzt beschäftigenden Vibrionen zu wählen, so können wir wohl die Stämme Aal I und Aal V als identisch betrachten, ebenso wie die Stämme Aal IV, P I und P II bzw. H I, H II, Sch 6, 10, 16 und 24. Oder: wenn man z. B. aus einem kranken Fisch unserer Küstengewässer Vibrionen reinzüchtet, die sich von einem mit dem Stamm H I hergestellten Kaninchenserum annähernd oder ganz bis zur Titergrenze agglutinieren lassen, so können sie wohl ohne vorherige,

zeitraubende Prüfungen in allerlei Kulturmedien als *V. anguillarum* B bezeichnet werden. Die Ergebnisse der oben geschilderten Agglutinationsprüfungen der mir vorgelegenen Vibrionen können meines Erachtens dagegen nicht in der Weise gedeutet werden, dass die fünf Agglutinationstypen ebenso viele *Vibrio*-Arten oder -Formen ausmachen sollten; sie können nur als fünf verschiedene Agglutinationstypen innerhalb einer und derselben Art angesehen werden. Auch muss man natürlich damit rechnen, dass es ausser diesen fünf Agglutinationstypen auch noch andere geben kann; Vibrionen, die durch diese Sera nicht agglutiniert werden, können also trotzdem sehr wohl der Art *anguillarum* angehören.

Wenn man die Vibrionen schon in Reinkultur hat, oder wenn man sie einer noch geschlossenen Beule entnehmen kann, so ist eine Prüfung gegen bekannte Sera in *Wassén*-Gläsern sehr leicht ausführbar. In Fällen von Mischinfektionen kann natürlich das Bild der Agglutination durch das Heranwachsen von nicht agglutinablen Bakterien verwischt werden. Es muss dann wenn möglich die Zusammensetzung des Agars derart verändert werden, dass die nicht gewünschten Bakterien in ihrer Ausschwemmung verhindert sind, ohne die gesuchten Bakterien dadurch zu beeinflussen. Zwecks *paratyphus*-Diagnose hat *Wassén* gefunden, dass ein Zusatz von Natriumselenit und Brilliantgrün die im Fäzesmaterial stets reichlich vorhandenen *coli*-Bakterien stark hemmt, ohne auf eventuell vorhandene *paratyphus*-Bakterien eine hemmende Wirkung auszuüben. Für *V. anguillarum* wäre natürlich ein erhöhter NaCl-Gehalt des Agars das erste, woran man in diesem Zusammenhange denken könnte. In Versuchen mit halbfestem Agar von 3 % NaCl-Gehalt (also das 10fache der ursprünglich vorgeschriebenen Menge) habe ich gefunden, dass verschiedene mir vorliegende Stämme von *V. anguillarum* nur wenig, andere Bakterien, wie *V. piscium*, *Ps. punctata* und *fluorescens* sowie einige als *B. proteus* und *paracoli* bestimmte Arten dagegen sehr stark gehemmt werden; wird ein *V. anguillarum*-Stamm zusammen mit einem dieser Bakterien in ein Glas geimpft, so entsteht zuerst eine klare Zone um den mit dem homologen Vibrioserum durchtränkten Papierstreifen herum, die erst mehrere Stunden später, oft erst am folgenden Tage, durch die anderen Bakterien getrübt wird. Diese Versuche wurden jedoch mit alten Laboratoriumstämmen angestellt; inwieweit sich diese Methode auch in den Fällen bewähren wird, in welchen man z. B. Impfmateriel für die Gläser direkt aus offenen Geschwüren kranker Fische oder aus dem Blute bzw. den Organen schon verendeter Exemplare nimmt, habe ich leider keine Gelegenheit gehabt zu prüfen.

Diese Art der Diagnostik, also mit unbekanntem Bakterien gegen bekannte Sera, ist aber nicht die einzig mögliche. Mit der Feststellung, dass Fische

nach überstandener Infektion in ihrem Serum Agglutinine gegen den Erreger besitzen, ist nämlich auch die schon von *Aaser* beachtete Möglichkeit gegeben, unbekannte Sera gegen bekannte Bakterien zu prüfen, um daraus Aufschlüsse über die Natur der Krankheit zu erhalten. Schon in den oben besprochenen Impfaalen A VII und B X haben wir Beispiele hiervon gefunden. An dieser Stelle möchte ich ein weiteres Beispiel anführen. Am 10. XI. 1932 wurden einige Aale eingekauft, die angeblich an der Küste in der Nähe von Stockholm gefangen worden waren. Einer derselben hatte zwei etwa 3 cm lange hautlose Stellen knapp hinter einander am Bauch, die von stark hämorrhagischer, zum Teil nekrotisierter Haut umgeben waren; starke Hautrötungen waren auch an der rechten Seite des Kopfes, an der Afterflosse sowie um den After herum zu beobachten. In ein Aquarium eingesetzt, führte der Aal "wackelnde" Schwimmbewegungen aus und bildete, wenn auf dem Boden liegend, mit dem Körper einen nach oben gerichteten Bogen, derart dass die beschädigte Partie des Bauches mit dem Boden nicht in Berührung kam. Um zu entscheiden, ob der Aal an einer fortgeschrittenen Infektion litt oder nur während der Hälterung beschädigt worden war, wurden mit Material aus dem steril entnommenen Blute Kulturen auf Agarplatten sowie in Bouillon angelegt. Beide blieben steril. Mit dem gewonnenen Serum wurden Papierstreifen getränkt und in mit den Stämmen Aal IV, Aal V, Sch I und Sch XVII geimpften Gläsern eingesetzt. Am folgenden Tage war das Glas mit dem Stamm Sch I positiv, in den übrigen Gläsern waren aber die ausgeschwärmten Vibrionen nicht gehemmt worden. Eine Röhrenagglutination zeigte, dass das Serum des Aals den Stamm Sch I bis zur Verdünnung 1:640 agglutinieren konnte. Hiemit war ja erwiesen, dass der Aal an einer *anguillarum*-Infektion gelitten hatte, und zwar durch Vibrionen desselben Agglutinationstypus hervorgerufen, die im Jahre 1927 die Hechtpest bei Rügen verursachten. Auch in vorgeschrittenen Krankheitsfällen, in welchen Abimpfungen aus dem kranken bzw. toten Fisch negativ ausfallen, kann es also möglich sein, durch derartige Prüfungen von "Patientensera" gegen bekannte Bakterienstämme eine Diagnose zu stellen.

2. *Ist mit einer erworbenen Immunität bei Fischen nach überstandener Infektion zu rechnen?*

Wie ich schon oben bemerkt habe, ist wiederholt angenommen worden, dass die überlebenden Fische eines verseuchten Bestandes Immunität gegen den betreffenden Erreger erwerben, ohne dass meines Wissens für diese Anschauung direkte Beweise vorgebracht wurden; bei *Schäperclaus* (1927,

p. 118) wird allerdings über einen Aal berichtet, der zuerst als Versuchsaal VI und, nachdem er sich erholt hatte, als Versuchsaal X aufs neue geimpft wurde; er erholte sich „nach einiger Zeit wieder, das Tier war offenbar immun geworden.“ In Anbetracht dessen, dass er sich schon nach der ersten Impfung erholte, scheint mir aber dieser Fall für die vorliegende Frage nicht besonders beweiskräftig. Da wir durch die oben angeführten Versuche gefunden haben, dass Fische sowohl nach künstlicher, als auch nach natürlicher Infektion Agglutinine bilden, gewinnt aber die Annahme eine weitere Stütze. Die Bildung von Agglutininen ist zwar keine Immunitätsreaktion in dem Sinne von Krankheitsschutz und geht ja bekanntlich nicht immer der Bildung anderer Immunkörper parallel, in den meisten Fällen kann sie aber wohl als Anzeichen von Antikörperbildung überhaupt aufgefasst werden, wie dies z. B. bei der Schutzimpfung beim Menschen gegen Typhus u. s. w. geschieht. Wir können also nunmehr, wenigstens in gewissen Fällen (hinsichtlich der ansteckenden Bauchwassersucht beim Karpfen scheint dies nach *Schäperclaus* 1933 p. 4 nicht der Fall zu sein) damit rechnen, dass die überlebenden Fische eines verseuchten Bestandes Immunität gegen den betreffenden Erreger erwerben. Gerade hinsichtlich der von *V. anguillarum* hervorgerufenen Rotseuche unserer Aalbestände sind aber die Verhältnisse etwas komplizierter. Wenn *Schäperclaus* (1934, p. 213) sagt: „Glücklicherweise kann mit einer allmählichen Immunisierung der Aalbestände gerechnet werden“, so scheint mir dies nur zum Teil, und zwar in bezug auf die Fressaale unserer Küstengewässer zutreffend und ist wohl auch nicht anders gemeint; die alljährlich aus den Seen und Flüssen des Ostseegebietes herauswandernden Blankaale haben ja während ihres Aufenthaltes im Süßwasser keine Gelegenheit gehabt, mit diesen Krankheitserregern infiziert zu werden und haben folglich auch keine Immunität gegen sie erwerben können; sie sind folglich immer der Gefahr ausgesetzt, bei der Auswanderung durch die Ostsee infiziert zu werden. Ebenfalls muss man den Umstand im Auge behalten, dass die Krankheitserreger in verschiedenen Agglutinationstypen vorkommen, und dass eine überstandene Infektion mit einem Erreger des einen Typus anscheinend nicht Immunität gegen Erreger anderer Typen derselben Bakterienart bewirken.

Sehr lehrreich in dieser Hinsicht scheint mir ein Studium der Epidemiologie der Vibrionenseuchen in der Ostsee während der letzten Jahrzehnte zu sein. Bis 1931 sind, von Einzelfällen abgesehen, hauptsächlich die Aalrotseuche im Bezirk von Rügen und Stralsund in den Jahren 1925—26 sowie die Hechtpest bei Rügen in den Jahren 1925—27 zu verzeichnen. Besonders bezüglich der ersteren bemerkt *Schäperclaus* (1934, p. 202), dass in erster Linie grosse, blanke Wanderaale erkrankten. Bei der im Jahre 1931 sowohl

an den deutschen als auch an den dänischen Ostseeküsten aufflackernden und im Jahre 1932 noch andauernden Epidemie wurden aber auch die Wohnaale in grosser Ausdehnung von der Krankheit befallen. Bezüglich der deutschen Verhältnisse sagt Schäperclaus (1934, p. 204): *''Zusammenfassend kann also über den Verlauf der Vibrio-anguillarum-Seuche in den letzten Jahren festgestellt werden, dass im Gegensatz zu früher, wo im Frühjahr die Hechte und im Herbst die Wanderaale erkrankten, eine Massenerkrankung der Wohnaale in sämtlichen Bodden und Buchten der Ostsee mit hinreichendem Salzgehalt aufgetreten ist.*

Ich stelle mir auf Grund der bisherigen Befunde den Verlauf der Epidemie in ihrer Gesamtheit so vor, dass *zunächst die Anfälligkeit der Fische massgebend war* für das Auftreten und die Ausbreitung der Seuche, es erkrankten die in der Laichzeit anfälligen Hechte und die anfälligen Wanderaale. Nunmehr aber, nachdem die Virulenz, insbesondere, wenn ich einmal so sagen darf, die Aalvirulenz der Erreger stark gestiegen ist, ist für den Umfang der Aalseuche ein *anderer Faktor massgebender geworden, nämlich die höhere Wachstums- und Vermehrungsgeschwindigkeit der Vibrionen bei Temperaturen von annähernd 20 °C* und mehr.

Relativer Sauerstoffmangel und leichte Verunreinigung des Wassers mögen allerdings gleichzeitig die Lebensumstände der Aale in den Bodden im Sommer verschlechtern, ihre *Anfälligkeit erhöhen*, ohne auf Vermehrung und Angriffskraft der Erreger hemmend zu wirken."

Ohne die Richtigkeit dieser Erklärung verneinen zu wollen, scheint mir aber die Möglichkeit vorzuliegen, diesen Erscheinungen eine andere Deutung zu geben. Wenn wir die allerdings spärlichen bakteriologischen Befunde zusammenstellen, so ergibt sich etwa folgendes. Alle aus der südlichen Ostsee und den angrenzenden Gebieten vor dem Jahre 1931 näher untersuchten Vibrionen, wenn wir von den Dorschvibrionen absehen, gehören unzweifelhaft zu dem oben näher charakterisierten A-Typus und zwar, soweit bekannt, den Agglutinationstypen Aal IV, A V und Sch I; es ist zu bedauern, dass die aus dem Jahre 1925 aus Rügen stammenden Aalvibrionen nicht mehr vorhanden sind, so dass nichts über ihre agglutinatorischen Eigenschaften ermittelt werden kann; ihre Zugehörigkeit zum A-Typus ist allerdings durch ihre Fähigkeit, Indol zu bilden, über jeden Zweifel erhaben. Alle jene Vibrionen, die in den Jahren 1931—32 an der deutschen und der dänischen Küste gewonnen wurden, sind dagegen mit Ausnahme des einen Stammes aus Lübeck (vgl. p. 27) zum Typus B zu rechnen; sie scheinen, nach den von mir untersuchten sechs Stämmen zu urteilen, alle einem einzigen, von den drei eben erwähnten verschiedenen Agglutinationstypus anzugehören.

Ich stelle mir die Sache nun so vor, dass der Bestand der Wohn- oder Fressaale in der südlichen Ostsee in den 20er Jahren gegen *V. anguillarum A* zum grossen Teil schon immun war (es wurden ja hauptsächlich die aus Süsswasser herauswandernden Blankaale befallen), und dass dies nach der Epidemie 1925—27 auch mit den Hechten und den anderen stationären Fischarten der Fall war. Gegen den seit 1931 auftretenden *anguillarum B* half aber diese Immunität der Wohnaale nicht, sie wurden deshalb ebenso wie die Wanderaale angegriffen. Es scheint mir ferner nicht unwahrscheinlich, dass die Erreger des B-Typus mit dem Oberflächenwasser des baltischen Stromes weiter nordwärts befördert wurden und auf diese Weise zu den in der Einleitung erwähnten Aalsterben an der Westküste Schwedens im Jahre 1932 und an der Südwestküste Norwegens im Jahre 1933 Anlass gaben; leider liegen ja von diesen Epidemien keine bakteriologischen Untersuchungen vor, diese Frage muss also unbeantwortet bleiben.

Für die Wohnaale dieser Gebiete, wenigstens für die des Ostseegebietes, kann man wohl damit rechnen, dass sie allmählich in grossem Umfange auch gegen *anguillarum B* immun werden. Besonders interessant wäre zu erfahren, ob die Aale in den ersten Lebensjahren an unseren Küsten eine *anguillarum*-Infektion leichter überstehen als bei vorgeschrittenerem Alter, also etwa wie dies gegen Scharlach, Masern und andere Kinderkrankheiten beim Menschen der Fall ist.

Mit obiger Auseinandersetzung will ich indessen nicht gesagt haben, dass der *anguillarum B* ein etwa um 1930 neu entstandener Typus sei, obwohl eine derartige Deutung rein theoretisch nicht ganz in Abrede zu stellen ist; er wäre wohl dann am ehesten aus dem ebenfalls im Rügener Gebiet früher vorhandenen, durch den Stamm Sch I vertretenen Agglutinationstypus hervorgegangen, der ja unter den von mir untersuchten Stämmen am schwächsten Indol bildete und auch in agglutinatorischer Hinsicht dem *anguillarum B* am nächsten zu stehen scheint. Ich stelle mir vielmehr vor, dass er auch früher vorhanden war, ohne als Seuchenerreger eine grössere Rolle gespielt zu haben. Als in den letzten Jahren, wie es *Schäperclaus* anzunehmen scheint, die Lebensumstände der Aale verschlechtert und ihre Anfälligkeit dadurch erhöht war, ohne dass die dies bewirkenden Faktoren auf die Vermehrung und Angriffskraft der vorhandenen Vibrionen hemmend wirkten, waren ja jene Vibrionen im Vorteil, gegen welche die geringste Immunität des Aalbestandes vorhanden war, was ein Überhandnehmen derselben zur Folge hatte.

Ich bin mir sehr wohl bewusst, dass ich mit diesen Auseinandersetzungen einen sehr hypothetischen Boden betreten habe; es geschah aber mit voller Absicht. Gerade weil ich der Meinung bin, dass die zur Zeit wenig erforschten

epidemiologischen Fragen bei Fischen auch von grosser praktischer Bedeutung sein können, habe ich hiedurch die Aufmerksamkeit darauf richten wollen, dass bei den Untersuchungen über die bakteriellen Fischkrankheiten die serologischen Beobachtungen ihre Bedeutung für das Verständnis vieler Fragen haben können und deshalb nicht allzu sehr vernachlässigt werden sollten.

3. Ist eine Schutzimpfung gegen Bakterieninfektionen bei Fischen denkbar oder möglich?

Mit der Feststellung, dass Fische gegen eingepfote Bakterien Antikörper bilden und somit allem Anschein nach immunisiert werden können, ergibt sich die Frage von selbst, ob eine Schutzimpfung von Fischen auch praktisch möglich wäre. Es ist wohl überflüssig besonders zu betonen, dass mit Rücksicht auf die Fischbestände der freien Gewässer eine solche Massnahme undenkbar ist. Bei der Bekämpfung der von *Vibrio anguillarum* hervorgerufenen Seuchen unserer Küstengewässer muss sie also leider ganz ausser Acht gelassen werden.

Anders verhält es sich aber mit den Zuchtfischen der Teichwirtschaft, die ja meistens ein- bis zweimal jährlich beim Abfischen durch die Hand des Züchters gehen. Der Gedanke, Teichfische zu immunisieren ist schon von mehreren Seiten vorgebracht worden, ohne dass er meines Wissens jemals in die Tat umgesetzt wurde. So äussert z. B. *Schäperclaus* in seinem gedankenreichen Vortrag: "Bakterielle Karpfenseuchen, ihre Bedeutung und Bekämpfung in der Teichwirtschaft." (1933, p. 7): "Die Stärkung der Widerstandsfähigkeit durch Schutzimpfung endlich, die entweder durch Einspritzung abgeschwächter Krankheitserreger (aktive Immunisierung) oder durch Einspritzung von Immunserum (passive Immunisierung) oder durch ein kombiniertes Verfahren (Simultanschutzimpfung) herbeigeführt werden könnte, scheidet wieder an der Kostenfrage. Eine natürliche Immunisierung durch *absichtliche Ansteckung* aller Fische zu einem günstigen Zeitpunkt verspricht keinerlei Erfolg, denn es muss angenommen werden, dass sie lediglich zur stummen Infektion des Verdauungskanals und nicht zur Immunisierung für das ganze Leben führt."

Durch die im Kap. II oben angeführten Ergebnisse hinsichtlich der Antikörperbildung bei Fischen scheint mir die Frage der Möglichkeiten, bakterielle Erkrankungen unserer Zuchtfische durch Schutzimpfung vorzubeugen, in ein derartiges Stadium getreten zu sein, dass sie aufs Neue zur Diskussion gestellt werden kann.

Was zuerst die Kostenfrage anbelangt, so hat *Schäperclaus* gewiss darin recht, dass sie in vielen, vielleicht sogar in den meisten Fällen, einer Schutzimpfung des ganzen Fischbestandes einer Teichwirtschaft hindernd im Wege steht; es würde aber wohl bei gewissen Gelegenheiten schon von grossem Vorteil sein, wenn nur ein Teil des Bestandes, und zwar dann wertvollere Stücke, wie z. B. Laichkarpfen und dergl., bei drohender Gefahr auf diese Weise geschützt werden könnten.

Zweitens möchte ich darauf hinweisen, dass die Gefahr, durch eine aktive Immunisierung stumme Infektionen hervorzurufen, damit wegfällt, dass die Einimpfung inaktivierter, also abgetöteter Bakterien eine ebenso starke Auslösung der antikörperbildenden Kräfte des Organismus zu bewirken scheint, als wenn lebende Bakterien dazu benützt werden. In der Tat scheinen mir durch die Feststellung, dass schon eine einmalige Einspritzung einer verhältnismässig kleinen Menge inaktivierter Bakterien genügt, um die Antikörperbildung hervorzurufen, drei wichtige Voraussetzungen für eine praktische Durchführung von Schutzimpfungen gegeben.

Die weitaus grössten Schwierigkeiten bei der praktischen Verwendung der Schutzimpfung scheinen mir indessen darin zu liegen, ein geeignetes Impfmateriale zu erhalten. Wie wir aus den obenstehenden Untersuchungen gesehen haben, setzt sich *V. anguillarum* aus mehreren Agglutinationstypen zusammen, und wir fanden ja auch, dass diese derart spezifisch sind, dass eine Einimpfung mit Material des einen Typus die Bildung von Antikörpern oder wenigstens von Agglutininen nur gegen diesen, nicht aber gegen die übrigen Typen bewirkt. Dass sich auch andere Krankheitserreger der Fische aus mehreren Agglutinationstypen zusammensetzen, habe ich u. a. bei *Pseudomonas punctata* konstatieren können. Es muss also von Fall zu Fall eine serologische Prüfung der seuchenerregenden Bakterien vorgenommen werden um festzustellen, ob schon ein Stamm als Antigen genügt oder ob deren mehrere dazu verwendet werden müssen. Dass solche Untersuchungen zeitraubend sind und folglich auch eine frühzeitige Verwendung der Schutzmassnahmen verhindern können, versteht sich von selbst.

Zusammenfassend möchte ich also hervorheben, dass wir von einer praktischen Ausnützung der Schutzimpfung noch weit entfernt sind; es ist noch nötig, unsere Kenntnisse mancher damit zusammenhängender Fragen durch Beobachtungen und Versuche zu vertiefen und zu erweitern. Die Möglichkeit, unter gewissen Bedingungen und in gewisser Ausdehnung eine Schutzimpfung als Hilfsmittel bei der Bekämpfung von bakteriellen Krankheiten unserer Zuchtfische zukünftig verwenden zu können, ist indessen meiner Meinung nach nicht ohne weiteres abzufertigen, sie scheint mir vielmehr in erreichbarer Nähe zu liegen.

Svensk resumé.

Föreliggande arbete utgör resultaten av bakteriologiska undersökningar över en hos fiskar sjukdomsalstrande bakterie, *Vibrio anguillarum* Bergman, kanske främst känd som alstraren av rödsjukan eller röda böldsjukan hos ål i saltvatten. Arbetets första upprinnelse bestod i undersökning av en hösten 1930 till K. Lantbruksstyrelsen insänd, sjuk ål; då jag denna tid arbetade på Hälsovårdsnämndens bakteriologiska laboratorium i Göteborg, erbjöd sig ett lämpligt tillfälle att mera ingående studera sjukdomsalstraren i fråga.

Från början endast avsedd att fastställa sjukdomsorsaken, svälde denna undersökning ut till att beröra mera allmänna problem, bland annat den hittills föga utredda frågan om fiskars förmåga att alstra motgifter (antikroppar) mot bakterier; ett mera allsidigt behandlande av dessa senare frågor har kunnat ske endast tack vare de utmärkta möjligheter till experimentella undersökningar som den nyinrättade Undersöknings- och försöksanstalten för sötvattensfisket erbjuder.

Den sjukdomsalstrande bakterie, som det här är fråga om, beskrevs först av framlidne professor *A. Bergman* från sjuka ålar vid Limhamn. Den har sedan visat sig kunna uppträda som sjukdomsalstrare hos ett flertal olika slag av våra kustfiskar. Sålunda fann *Bergman* den några år senare såsom framkallande en ögonsjukdom hos torsk vid Skånes sydkust och han erhöll den vidare vid undersökning av ett fall av tandköttsinflammation hos gädda från Södermanlands skärgård. Vid de av *Schäperclaus* undersökta farsoterna på ål och gädda vid Rügen och Stralsund i mitten av 1920-talet liksom under senaste åren har den likaledes konstaterats vara sjukdomsalstraren och slutligen hava de danska forskarna *Bruun* och *Heiberg* funnit den framkalla åldöd i de danska kustvattnen år 1931; av dessa forskare beskrevs den emellertid som en ny art, *V. anguillcida*.

De av mig iakttagna fallen äro följande:

1) I oktober och november 1924 anträffades i Gåsö Ränna ej långt från Kristinebergs zoologiska station i Bohuslän torskar med ögonsjukdom påminnande om den av *Bergman* från Skånes sydkust beskrivna. Då jag på den tiden ej hade tillfälle att utföra bakteriologiska undersökningar insändes materialet till Statens veterinärbakteriologiska anstalt i Stockholm, varifrån meddelades, att åtminstone i ett fall en bakterie påträffats som tycktes vara identisk med *Bergmans* vibrioner från torsk och att i ett par andra fall de sjukliga förändringarna överensstämde med de av *Bergman* beskrivna.

2) Andra fallet var den nyss omtalade till Lantbruksstyrelsen insända sjuka ålen. Den hade fångats 16 september 1930 vid Gräsgård på Ölands ostkust i ett ålbottengarn. Vid efterfrågan meddelades att man här ej sett några flera sjuka eller döda ålar.

3) Vid ett besök i Limhamn i april månad 1931 erfor jag av fiskare därstädes, att man så gott som årligen påträffade rödsjuka ålar liksom vid *Bergmans* undersökning för 25 år sedan; det har emellertid ej lyckats mig att för närmare undersökning erhålla något material därifrån.

4) Hösten 1931 inlämnades till Hälsovårdsnämndens bakteriologiska laboratorium från Göteborgs Sjöfartsmuseums akvarium en sjuk piggvar, i vilken likaledes *V. anguillarum* anträffades. Man meddelade från akvariet att i de stora saltvattensakvarierna nästan årligen uppträdde fiskdöd då vattnet var som varmast; det var framförallt torsk- och flundrefiskar som angrepos men även andra såsom knot, snultrefiskar o. s. v. Sjukdomstecknen voro de vid rödsjuka vanliga: hudrodnader, blodsprängda, senare upprispade fenor och i några fall även blindhet.

5—6) Slutligen har jag vid blodundersökning av ålar i tvenne fall kunnat fastställa att ålarna ifråga, fångade den ena utanför Göteborg, den andra i Stockholms skärgård, tidigare måste ha varit behäftade med nämnda sjukdomsalstrare.

Utom de nu nämnda fynden, vid vilka alla anträffats vibrioner, känner man en hel rad fall av fisksjukdomar, framförallt av rödsjuka hos ål utefter våra kuster liksom utefter de danska, utefter norska skagerackusten liksom vid tyska östersjökusten, vilka visserligen ej blivit bakteriologiskt undersökta men där sjukdomsalstraren med all sannolikhet likaledes varit vibrioner. Det torde alltså av ovan berörda förhållanden framgå, att den här behandlade bakterien såsom alstrare av fisksjukdomar utefter de nordiska ländernas kuster spelar en synnerligen viktig roll och därför i högsta grad är värd att noggrant studeras.

Såsom i den utförliga texten närmare behandlats, kan *Vibrio anguillarum* karakteriseras på följande sätt: Kommaformiga, med ett gissel försedda, livligt rörliga, gramnegativa bakterier utan spor- eller kapselbildning, vilka smälta gelatina (gelatinastickkultur koleralik), bilda ej gas men syra i druvsocker och maltsocker, bilda ej vätesvavla, sakna reduktionsförmåga, äro hämolytiska (blott fastställt för vissa stammar), saltbehövande (undre NaCl-gräns ca 0,07 %) och sjukdomsalstrande hos fiskar.

Med avseende på förjäsning av rörsocker och mannit liksom beträffande förmåga att bilda indol förhålla sig emellertid de hittills undersökta stammarna olika. Man kan därför urskilja en A-form (forma *typica*) som äger förmåga att bilda syra i de nämnda sockerarterna och som dessutom är indolbildare och en B-form (forma *anguillicida*), som saknar dessa egenskaper. Huruvida den i ögat hos torskar funna formen, vilken uppgives kunna bilda syra även i mjölksocker, en egenskap som de övriga sakna, representerar en särskild typ torde först kunna avgöras efter en förnyad undersökning.

För att fastställa, huruvida de av mig funna vibriostammarna verkligen voro sjukdomsalstrande, hava en rad försök med inympning av vibrio-material på friska ålar och andra fiskar verkställt. I regel ha de ympade fiskarna insjuknat i typiska rödsjukesymptom, och i en del fall ha försöksdjuren dött som följd av ympningen. Ofta ha hos ålarna de av *Bergman* beskrivna bölderna uppstått, i regel vid ympstället men i åtminstone ett fall rätt långt bort från detta.

I de fall då de ympade fiskarna tillfrisknade, verkställdes undersökningar över blodserums halt av vissa motgifter eller antikroppar (agglutininier), något som tidigare till synes ej blivit utfört. Då i samtliga dessa fall en stark agglutininbildning kunde fastställas, har denna för förståelsen av infektionssjukdomarna hos fiskar principiellt viktiga fråga belysts genom talrika experiment. Resultaten av dessa undersökningar kunna sammanfattas i följande punkter:

- 1) Fiskar (ål, sutare, abborre, lake) reagera mot inympning av bakterier genom bildandet av agglutininier.
- 2) Serums agglutininhalt är i allmänhet hög och agglutininerna äro lika specifika som de hos varmblodiga djur bildade.
- 3) Agglutininbildning framkallas såväl av levande som av vid måttlig värme dödade (inaktiverade) bakterier.
- 4) Agglutininbildningen försiggår avsevärt hastigare vid högre (18—20° C) än vid lägre (7—10° C) temperatur.

Då agglutininbildning får anses som ett uttryck för förmågan att alstra motgifter mot bakterier över huvudtaget, eller att med andra ord framkalla immunitet, d. v. s. oemottaglighet för bakterien ifråga, synas alltså vissa förutsättningar givna för att i praktiken kunna utföra skyddsympning av fiskar.

Schriftenverzeichnis.

- 1925 *Aaser, C. S.*: Gjeddepesten i 1923. Norsk Veterinærtidsskrift. Oslo.
- 1903 *Babes, V., & Riegler, P.*: Über eine Fischepidemie bei Bukarest. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. Bd 33. Jena.
- 1909 *Bergman, A.*: Die rote Beulenkrankheit des Aals. Ber. d. K. Bayer. Biolog. Versuchsstation in München. Bd II. Stuttgart.
- 1911 *Bergman, A.*: En smittosam ögonsjukdom, Keratomalaci, hos torsk vid Sveriges sydkust. Skandinavisk Veterinär-Tidskrift, 1911. Upsala.
- 1932 *Bruun, A., & Heiberg, B.*: The 'Red Disease' of the Eel in Danish Waters. Meddelelser fra Kommissionen for Danmarks Fiskeri- og Havundersøgelser. Serie: Fiskeri, Bind IX. Nr. 6. København.
- 1927 *David, H.*: Ueber eine durch choleraähnliche Vibrionen hervorgerufene Fischseuche. Zentralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. Bd 102. Jena.
- 1924 *Plehn, M.*: Praktikum der Fischkrankheiten. Stuttgart.
- 1927 *Schäperclaus, W.*: Die Rotseuche des Aales im Bezirk von Rügen und Stralsund. Zeitschrift f. Fischerei. Bd XXV, Heft 1. Neudamm und Berlin.
- 1928 *Schäperclaus, W.*: Die Hechtpest in Brandenburg und Rügen. Ibid. Bd. XXVI, Heft 3.
- 1930 *Schäperclaus, W.*: Pseudomonas punctata als Krankheitserreger bei Fischen. Ibid. Bd. XXVIII, Heft 3.
- 1933 *Schäperclaus, W.*: Bakterielle Karpfenseuchen, ihre Bedeutung und Bekämpfung in der Teichwirtschaft. Sonderdruck aus Nr. 15, 16 und 17, Bd. 36 (1933) der Fischerei-Zeitung. Neudamm.
- 1934 *Schäperclaus, W.*: Untersuchungen über die Aalseuchen in deutschen Binnen- und Küstengewässern 1930—1933. Zeitschr. f. Fischerei. Bd XXXII, Heft 2. Neudamm und Berlin.
- 1930 *Wassén, A.*: Sur une méthode d'enrichissement des Bacilles paratyphiques, basée sur la mobilité et l'agglutination directe des Bacilles dans le milieu. Comptes rendus des séances de la Société de biologie. Tome CIV, p. 523.
- 1897 *Widal et Sicard*: Influence de l'organisme sur les propriétés acquises par les humeurs du fait de l'infection. (L'agglutination chez quelques animaux á sang froid.) C. R. Soc. Biol. 49. p. 1047. Paris.
-

1911. *O. Nordqvist, Th. Elman och C. Schmidt*. Undersökningar rörande svenska laxförande vattendrag. III. Dalälven. Nr 163. Pris kr. 1:—.
1914. *Ivar Arwidsson*. Spridda studier över vanliga kräftan. Nr 192. Pris kr. 0:30.
1915. Fiskeribyrån. Undersökningar rörande Sveriges fiskerier, fiskar och fiskevatten. Nr 195. Pris kr. 0:50.
- *) 1917. *Gunnar Alm*. Undersökningar rörande Hjälmarens naturförhållanden och fiske. Nr 204. Pris kr. 1:—.
1918. *Nils Rosén*. Undersökningar över laxen och laxfisket i Norrbottens län. Nr 208. Pris kr. 1:—.
1918. *Ivar Arwidsson*. Från sjön Öjaren. Nr 210. Pris kr. 0:50.
1918. *Nils Rosén*. Om laxöringen i övre Norrland. Nr 212. Pris kr. 0:60.
1918. *Nils Rosén*. Om laxen och laxfisket i Västerbottens län. Nr 214. Pris kr. 1:50.
- *) 1919. *Gunnar Alm*. Mörrumsåns lax och laxöring. Nr 216.
1919. *Gunnar Alm*. Fiskeribiologiska undersökningar i sjöarna Toften, Testen och Teen (Nerike). Nr 218. Pris kr. 1:75.
- *) 1920. *Ivar Arwidsson*. Kräftstammen i en källklar sjö i Södermanland. Nr 222. Pris kr. 1:25.
1920. *Nils Rosén*. Om Norrbottens saltsjöområdes fiskar och fiske. Nr 225. Pris kr. 4:25.
1920. *Gunnar Alm*. Resultaten av fiskinplanteringar i Sverige. Nr 226. Pris kr. 3:75.
- *) 1920. *Ivar Arwidsson*. Om kräftpesten i Sverige. Anteckningar under åren 1907—1919. Nr 229. Pris kr. 4:—.
1921. *David Nilsson*. Några insjöfiskars ålder och tillväxt i Bottniska viken och Mälaren. Nr 231. Pris kr. 1:60.
- *) 1921. *G. Alm, T. Freidenfelt m. fl.* Klotentjärnarna. Fiskerivetenskapliga undersökningar utförda på uppdrag av Kungl. Lantbruksstyrelsen. Nr 232.
1922. *T. Freidenfelt*. Undersökningar över gösens tillväxt i Hjälmaren. Nr 235. Pris kr. 2:—.
- *) 1922. *Gunnar Alm*. Bottenfaunan och fiskens biologi i Yxstasjön m. m. Nr 236. Pris kr. 4:—.
1922. *Christian Hessle*. Om Gotlands kustfiske. Nr 238. Pris kr. 1:75.
1922. *Gunnar Alm*. Fiskeristudier i mellersta Europa. Nr 239. Pris kr. 2:—.
1923. *K. A. Andersson, Chr. Hessle, A. Molander, O. Nybelin*. Fiskeribiologiska undersökningar i Östersjön och Bottniska viken. Nr 243. Pris kr. 3:50.
- *) 1923. *Gunnar Alm*. Virkesflotningens inverkan på fisket. Nr 244. Pris kr. 3:—.
1923. *O. A. Sundberg*. Insjöfiske i Gästrikland. Nr 245. Pris kr. 1:50.
1924. *Christian Hessle*. Bottenboniteringar i inre Östersjön. Nr 250. Pris kr. 2:—.
- *) 1924. *Gunnar Alm*. Laxen och laxfiskets växlingar i Mörrumsån och andra Östersjöälvar. Nr 252. Pris kr. 3:50.
1924. *Ivar Arwidsson*. Några mjärdfisken i Svealand. Nr 253. Pris kr. 1:50.
1927. *Christian Hessle*. Sprat and Sprat-Fishery on the Baltic coast of Sweden. Nr 262. Pris kr. 0:75.
1927. *Gunnar Alm*. Undersökningar över Mälarens bottenfauna. Nr 263. Pris kr. 0:75.
1927. *Ivar Arwidsson*. Halländska laxfisken. Nr 266. Pris kr. 2:25.
1927. *Gunnar Alm*. Fiskeristudier i Förenta Staterna och Canada. Berättelse över en studieresa till Nordamerika under år 1926. Nr 267. Pris kr. 2:25.

*) Upplagan slut.

1927. *Osc. Nordqvist och Gunnar Alm.* Uppfödning av laxyngel. Bedögörelse över försök vid Kälarnes fiskodlingsanstalt. Nr 268. Pris kr. 1: 25.
1929. *Christian Hessle.* Strömmingsrökning, anläggning och drift av mindre rökerier. Nr 274. Pris kr. 0: 75.
1929. *Gunnar Alm.* Handledning i fiskevård och fiskodling. Nr 275. Pris kr. 0: 75.
1929. *Gunnar Alm.* Undersökning över laxöringen i Vättern och övre Motala ström. Nr 276. Pris kr. 1: 50.
1929. *Sten Vallin.* Sjön Ymsen i Skaraborgs län. Nr 277. Pris kr. 1: —.
1929. *Christian Hessle.* De senare årens fiskmärkningar vid Svenska Östersjökusten. Nr 278. Pris kr. 0: 75.

NY SERIE.

Meddelanden från Statens undersöknings- och försöksanstalt för sötvattensfisket.

1933. *Gunnar Alm.* Statens undersöknings- och försöksanstalt för sötvattensfisket. Dess tillkomst, utrustning och verksamhet. Nr 1. Pris kr. 0: 75.
1934. *Gunnar Alm.* Vätterns röding, fiskeribiologiska undersökningar. Nr 2. Pris kr. 0: 75.
1934. *Christian Hessle.* Märkningsförsök med gädda i Östergötlands skärgård åren 1928 och 1930. Nr 3. Pris kr. 0: 50.
1935. *Gottfrid Arvidsson.* Märkning av laxöring i Vättern. Nr 4. Pris kr. 0: 75.
1935. *Sten Vallin.* Cellulosafabrikerna och fisket. Experimentella undersökningar. Nr 5. Pris kr. 1: —.
1935. *Gunnar Alm.* Plötsliga temperaturväxlingars inverkan på fiskar. Nr 6. Pris kr. 0: 75.
1935. *Christian Hessle.* Gotlands havslaxöring. Nr 7. Pris kr. 0: 75.

Pris 1: 25 kr.