III. Aus dem hygienischen Institut der Universität
Königsberg i. Pr.

**Ueber die immunisirende Wirkung mit
Choleraamboceptoren beladener Cholera-
vibrionen.**

Von **R. Pfeiffer.**

(Schluss aus No. 50.)

Ferner war der schwerwiegende Einwand möglich, dass eine Absättigung der Choleravibrionen mit Amboceptoren der Ziege vielleicht nur einen Theil der Affinitäten dieses complizirten Gebildes für die Rezeptoren des Kaninchens sättigt, während andere frei bleiben und zur Produktion von Schutzstoffen anregen könnten.

Nach diesen Erwägungen mussten wir erwarten, dass die Verwendung des Serums choleraimmuner Kaninchen in unseren Ver-

suchen die Entstehung der Choleraantikörper entweder ganz verhindern oder doch in auffallender Weise verringern würde. Das Resultat entsprach nicht diesen Voraussetzungen.

Bei der theoretischen Wichtigkeit dieser Experimente wird deren genaue Beschreibung nicht unwesentlich erscheinen. Eine geringe Menge 12–18ständiger Choleraagarkultur (in der Regel 1 Oese) wurde mit 0,05 cm³ hochwirksamen Serums cholera-immuner Kaninchen (Titer $\frac{1}{5}$, resp. $\frac{1}{2}$ mg) versetzt und gleich darauf einem Meerschweinchen ins Peritoneum injiziert.

Diese Serumdosis stellt das mindestens 200fache Multiplum derjenigen Serummenge dar, welche zur Auflösung der einen Oese Cholera ausgereicht hätte, sodass ein sehr hoher Ueberschuss von Choleraantikörper verwendet wurde.

Eine Stunde nach der Injektion wurde nun das Meerschweinchen, in dessen Bauchhöhle unter Kügelchenbildung die bekannte rapide Auflösung der Vibrionen stattgefunden hatte, durch Nackenschlag getödtet.

Sofort danach wurden etwa 6–10 cm³ auf 37° erwärmter physiologischer Kochsalzlösung in die Bauchhöhle des Kadavers injiziert um damit den Inhalt des Peritoneums auszuwaschen. Die dann aus dem Peritoneum wiedergewonnene getrübbte Flüssigkeit wurde jetzt durch ein Berkefeldfilter filtrirt und so von allen corpuskulären Elementen, auch von den Zerfallsprodukten der Vibrionen, soweit diese noch nicht vollständig gelöst waren, befreit. Es resultirte eine absolut klare Flüssigkeit, deren Sterilität durch Einsaat in Bouillon und auf Agar jedesmal festgestellt wurde.

Sofort nach der Filtration wurde die Flüssigkeit einem Kaninchen in die Ohrvene injiziert. Vor dieser Injektion und acht Tage nach der Vorbehandlung wurde dann dem Kaninchen Blut entnommen und auf seinen Gehalt an Choleraschutzstoffen geprüft. Drei hierher gehörige Versuche sind in Tabelle III wiedergegeben.

Tabelle III.
Intravenöse Injektion des filtrirten Peritonealexsudats von Meerschweinchen, in deren Bauchhöhle zuvor Choleravibrionen durch wirksames Serum von mit Cholera immunisirten Kaninchen zur Auflösung gebracht worden waren.

Injektionsdosis intravenös	Gewicht des Kaninchens in g	Titer seines Serums vor Injektion	Tag der Titerprüfung nach Injektion	Titer nach Injektion	Bemerkungen.
Filtrirtes Peritonealexsudat eines Meerschweinchens nach der Auflösung von Choleravibrionen in demselben.	1650	0,2 schützt nicht.	VIII.	zwischen 0,0004 und 0,0005	Das Meerschweinchen hatte 1 Stunde vor der Entnahme des Peritonealexsudats intraperitoneal erhalten: 1 Oese Cholera, 0,01 wirksamen Kaninchenserums.
do.	2400	do.	VI.	zwischen 0,01 und 0,05	Das Meerschweinchen hatte 1 Stunde vor der Entnahme des Peritonealexsudats intraperitoneal erhalten: 1 Oese Cholera, 0,05 wirksamen Kaninchenserums. Bei der intravenösen Injektion des filtrirten Bauchhöhleninhalts beim Kaninchen gerieth ein Theil in das Subkutangewebe.
do.	1860	do.	VII.	zwischen 0,001 und 0,002	Das Meerschweinchen hatte 1 Stunde vor der Entnahme des Peritonealexsudats erhalten: 1 Oese Cholera. † 0,05 wirksamen Kaninchenserums.

Vorstehende Tabelle ergibt zu folgenden Bemerkungen Veranlassung. Auch bei dieser Versuchsanordnung acquirirten sämtliche Thiere einen sehr hohen Grad aktiver Immunität. Besonders gilt dies von Kaninchen No. I, wo der Titer des Serums den beträchtlichen Werth von etwa $\frac{1}{3}$ mg erreichte. Nur im Versuch II war eine relativ geringe Wirkung der Injektion zu verspüren, was mindestens zum Theil darauf zurückzuführen sein dürfte, dass hier die intravenöse Injektion nicht glatt gelang, sodass ein nicht unbeträchtlicher Antheil der zu injizirenden Flüssigkeit in das subkutane Gewebe eindrang.

Da es sich in diesen Versuchen um die Wirkung von gelösten Cholerasubstanzen handelt, die eben nur dann in gelöster Form übergehen konnten, wenn nicht allein die Amboceptoren, sondern auch die Complemente in das Bakterienmolekül verankert waren, so stehen wir hier vor einer gewissen Schwierigkeit, den thatsächlich beobachteten sehr starken immunisirenden Effekt auf Grund der Ehrlich'schen Theorie ohne allzu gezwungene Voraussetzung zu erklären.

In einer früheren Arbeit haben wir bewiesen, dass das normale Blut der Ziege Substanzen enthält, welche durch Cholera-bakterien ausgefällt werden können, während sie beispielsweise durch Typhusbazillen nicht gebunden werden.

Es war damals die Frage offen gelassen worden, ob diese Amboceptoren des normalen Serums mit den spezifischen bei der Immunisirung auftretenden identisch seien, wie es Ehrlich annimmt, oder ob es sich um eine Mehrheit von den spezifischen Immunkörpern analogen Substanzen handelt.

Die oben erwähnten Untersuchungen legten uns den Gedanken nahe, zu prüfen, wie der immunisirende Effekt von Cholerabakterien, welche die Amboceptoren des normalen Ziegenserums verankert haben, sich verhalten würde.

Wir verwendeten das in unserer früheren Arbeit (diese Wochenschrift 1901, No. 48) beschriebene normale Ziegenserum III, dessen Titer gegenüber Cholera zwischen 0,05 bis 0,01 gelegen war.

Die genaue Versuchsanordnung ist aus der folgenden Tabelle zu ersehen.

Tabelle IV.
Intravenöse Injektion kleiner Dosen todter Choleravibrionen nach Absättigung mit Normalziegenserum.

Dosis der Cholera	Dosis des Serums	Behandlung des Cholera-Cholera-serumgemisches bis zur Injektion	Gewicht des Thieres in g	Titer vor der Injektion	Tag der Titerprüfung nach der Injektion	Titer nach der Injektion	Agglutinationswerth
$\frac{1}{20}$ Oese Cholera bei 60° abgetödtet	0,5 normales Ziegenserum	Die Mischung bleibt 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wird Kaninchen intravenös injiziert	1200	0,2 schützt nicht	VII	zwischen 0,005 und 0,001	1 : 20
$\frac{1}{10}$ Oese Cholera bei 60° abgetödtet	0,9 normales Ziegenserum	do.	1650	do.	X	zwischen 0,001 und 0,005	1 : 20

Auch hier fanden wir wieder das Resultat, dass kleine Mengen von abgetödteten Cholera-vibrionen, die 12 Stunden lang mit einem mindestens 10—20fachen Multiplum der zu ihrer Auflösung im Meerschweinchenperitoneum nöthigen Dosis normalen Ziegen-serums in Contact waren, ihre immunisirende Wirkung in hohem Grade bewahrt haben. Besonders demonstirt dies der Versuch II, wo der erzeugte Titer fast ebenso hoch war, wie er bei Controll-thieren nach entsprechenden Dosen abgetödteter Cholera-kulturen ohne Serumsatz erreicht wird.

Es war also festzustellen, dass die Wirkung des normalen Ziegen-serums und der darin enthaltenen, auf Cholera-bakterien wirkenden Amboceptoren sich ähnlich wie die der Amboceptoren des Immunserums verhielt, nur war sie vielleicht quantitativ schwächer. Also auch auf diesem Wege liess sich eine sichere Differenzirung dieser beiden Amboceptorengruppen nicht erreichen. Im übrigen hätte man das Resultat dieser Versuche voraussehen können. Bei jeder Immunisirung mit lebenden oder todten Bakterien müssen die Bakterien-substanzen erst gelöst werden, ehe sie ihre Wirkung entfalten können und sonach mit Amboceptor und Complement in Verbindung treten.

Meine Versuche mit der Immunisirung von Ziegen gegen Cholera und Typhus aus den Jahren 1895—97 haben ferner be-wiesen, dass es möglich ist, auch bei Thieren, deren Blut enorme Mengen der spezifischen Amboceptoren enthält, durch fortgesetzte Injektion von Bakterien eine fortschreitende Produktion der spe-zifischen Schutzstoffe zu erzeugen. In diesen Experimenten wurden die injizirten lebenden oder todten Cholera-, resp. Typhus-bakterien im subkutanen Gewebe gelöst und gelangten mit Am-boceptor und Complement gesättigt in die Blutbahn, um dann hier noch einen geradezu enormen Ueberschuss von Amboceptoren anzutreffen.

Allerdings könnte man gegen diese Ausführungen folgenden Einwand erheben: Die Bindung der im Blute kreisenden Ambo-ceptoren mit den Vibrionstoffen braucht nicht sofort ihre volle Festigkeit zu erreichen, sodass eine Dissoziirung im Contact mit den Rezeptoren der möglicherweise empfänglicheren Körperzellen wohl möglich sein könnte.

In den Experimenten der Tabelle III dürfte das allerdings kaum

zutreffen, da von dem Moment der Injektion des Vibrionen-Cholera-serumgemisches in das Meerschweinchenbauchfell bis zur Injektion des filtrirten Exsudates in die Ohrvene des Kaninchens doch in minimo drei Stunden verfliessen mussten, sodass wohl Zeit genug vorhanden war, um eine feste Verbindung der Vibrionen mit ihren zugehörigen, in enormem Ueberschuss vorhandenen Amboceptoren herbeizuführen. Ferner haben wir absichtlich in einzelnen hier nicht aufgeführten Versuchen derartige Exsudat-filtrate, welche noch einen erheblichen Ueberschuss von Cholera-antikörpern enthielten, bis zu 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, ehe wir sie in die Ohrvene von Kaninchen injizirten, und auch hierbei die gleichen hohen Titrewerthe erhalten.

In vollem Gegensatz zu den bisher berichteten Resultaten stehen die folgenden Versuchsergebnisse: Wir besäten flache, mit Bouillon etwa 1 cm hoch gefüllte Kölbchen mit Cholera-bakterien und filtrirten die drei Tage im Brutschrank gewachsene Cholera-bouillon durch Berkefeldfilter. Das vollkommen klare, auf Sterilität geprüfte Filtrat erzeugte bei einem Controllkaninchen in Dosis von 5 cm³ bei subkutaner Einverleibung einen enorm hohen Schutzwerth des Blutes. (Titer unter 0,001 g; Agglutinationswerth 1 : 100). Von demselben Filtrat wurden je 5 cm³ mit je 1/2 cm³ Ziegencholera-serum (Titer 1/8 mg) versetzt und auf Eis gestellt. Nach 25 Stunden wurde das Gemisch, in dem sich ein ziemlich starker lockerer Niederschlag von ca. 2 cm Höhe gebildet hat (Präzipitinwirkung), zwei Kaninchen an vier Stellen subkutan in-jizirt. Das nach acht Tagen entnommene Blut zeigte sich in dem Versuch A in einer Dosis von 0,05 ganz unwirksam (leider wur-den höhere Dosen nicht geprüft); im Versuch B war ein deut-licher, jedoch immerhin auffällig geringer Werth, einem Titer von 0,01 entsprechend zu finden. Agglutination fehlte.

Da diese Experimente mit unseren früheren so wenig har-monirten, wurden sie auf breiter Basis nochmals wiederholt. Fünf Kaninchen erhielten Cholerafiltrate mit Ziegencholera-serum, wel-ches Gemisch verschieden lange Zeit gestanden hatte, die fünf Controllkaninchen, um die Experimente möglichst conform zu ge-stalten, dieselben Dosen des gleichen Cholerafiltrates, das aber mit entsprechenden Mengen Typhus-Ziegen-serum versetzt war.

Tabelle V.
Subkutane Injektion dreitägiger steriler Filtrate von Cholera-bouillonkulturen bei Kaninchen.
A. Ohne Serumzusatz.

Vorbehandlung mit	Das Gemisch von Cholerafiltrat und Serum blieb vor der Injektion im Eisschrank, während	Tag der Titer- prüfung nach der Injektion	Titer nach der Injektion	Agglutinations- werth
5,0 cm ³ eines dreitägigen Cholera- bouillonfiltrats	—	VIII	unter 0,001	1 : 100

B. Mit Zusatz von Serum gegen Cholera immunisirter Ziegen.
(30 cm³ Filtrat + 6 ccm³ Serum einer gegen Cholera immunisirten Ziege. Titre 1/8 mg)

5 cm ³ des Cholerafiltrat-Cholera- serumgemisches	1 Stunde	do.	0,3 schützt nicht	1 : 3
do.	do.	do.	ebenso	0.
do.	24 Stunden	do.	0,3 schützt nicht	1 : 3
do.	do.	do.	ebenso	ebenso
do.	3 Mal 24 Stunden	do.	Titer zwischen 0,05 und 0,3	1 : 3 0.

C. Mit Zusatz von Serum gegen Typhus immunisirter Ziegen.
(30 cm³ Cholerafiltrat + 6 cm³ Serum einer gegen Typhus immunisirten Ziege.)

5 cm ³ des Cholerafiltrat-Typhus- serum, gemischtes	1 Stunde	do.	Titer unter 0,005	1 : 25
do.	do.		ebenso	1 : 5
do.	24 Stunden	do.	Titer zwischen 0,005 und 0,02	1 : 20
do.	do.		ebenso	ebenso
do.	3 mal 24 Stunden	do.	Titer zwischen 0,005 und 0,01	1 : 40

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Aus obiger Tabelle geht mit Sicherheit hervor, dass das Cholera-Immunsorbum die Choleraabouillonfiltrate vollständig unwirksam zu machen im Stande ist und dass schon nach einer Stunde Contact der immunisierende Effekt geschwunden ist, während das Typhusziegensorbum, welches selbstverständlich hier nur die Wirkung eines normalen Ziegensorbums entfalten konnte, die immunisierende Kraft des Filtrates nicht vernichtete, wenn auch offenbar erheblich beschränkte.

Wir sehen also hier einen deutlichen Unterschied zwischen Cholera-Immunsorbum der Ziege und normalem Ziegensorbum. Doch würde es gewagt sein, daraus ohne weiteres auf eine Differenz der entsprechenden Amboceptoren zu schliessen, da die Menge des Filtrates recht erheblich war und möglicherweise das an Amboceptoren arme normale Ziegensorbum zur Sättigung nicht ausreichte.

Es werden diese Versuche mit erheblich kleineren an der Grenze der Wirkung stehenden Filtratdosen zu wiederholen sein, worüber wir s. Z. berichten werden.

Es ist nun interessant, dass nach den Arbeiten von Behring, Ransom, Roux, Metschnikoff und Salimbeni derartige Cholerafiltrate, in welchen nicht mehr die intakten Vibrionenstoffe enthalten sind, sondern deren durch die Wirkung ihrer eigenen Fermente abgebauten und dadurch wasserlöslich gewordenen Derivate sich auch bei der Immunisirung ganz anders verhalten als die lebenden oder schonend abgetödteten Vibrionensubstanzen.

Während letztere ausschliesslich bakteriolytische Körper erzeugen, regen erstere daneben auch die Bildung antitoxisch wirkender Antikörper an. Hervorzuheben ist, dass das von mir hier verwendete Choleraziegensorbum, welches ausschliesslich durch lebende Vibrionen erzeugt worden war, trotz alledem den immunisierenden Effekt der Cholerafiltrate aufzuheben vermochte. Offenbar liegen hier so verwickelte Verhältnisse vor, dass zur Zeit eine befriedigende Erklärung noch nicht gegeben werden kann.