Über die Wertbestimmung des Schutzkörpergehaltes menschlichen Serums durch intracutane Injektion von Diphtherietoxin beim Menschen.

Von

Dr. Jules Michiels (Löwen) und Privatdozent Dr. B. Schick.

(Aus der k. k. Universitäts-Kinderklinik in Wien [Vorstand Prof. C. v. Pirquet].)

(Eingegangen am 24. Oktober 1912.)

In einer vor kurzem erschienenen Publikation haben wir berichtet, daß jene Menschen, die auf intracutane Injektion unseres Diphtherietoxins in der Menge von 0,1 einer Verdünnung 1 : 1000 deutlich positiv reagieren, bei Untersuchung ihres Serums auf Schutzkörpergehalt (nach der Methode von Römer am Meerschweinchen geprüft) keinen Schutzkörper besitzen. Wir waren, genau genommen, nur in der Lage zu sagen, daß das Serum sicher weniger als 0,0155 IE. im cem unverdünnten Serums enthielt. Das Vorhandensein geringerer Mengen von Schutzkörpern konnte mit dieser Methodik nicht ausgeschlossen werden. Es war nur anzunehmen, daß in praxi solche vollkommen fehlen. Menschen, die auf die gleiche Dosis Diphtherietoxin vollkommen negativ reagierten, besaßen stets Schutzkörper im Serum. Zum mindesten paralyisierte das Serum des betreffenden Individuums noch in der Verdünnung 1 : 10 die gleiche Menge einer Toxinverdünnung 1 : 500 (beim Meerschweinchen). Der Schutzkörpergehalt war nach unseren Bestimmungen mit mindestens 0,031 IE. zu berechnen und mußte geringer sein als 0,07. Der wirkliche Wert war zwischen den beiden Zahlen gelegen. In anderen Fällen war der Schutzkörpergehalt des Serums größer, in einzelnen Fällen bis über 0,56 IE. Wir zogen aus unseren Versuchsergebnissen den Schluß, daß der Ausfall der Reaktion auf intracutane Injektion von Diphtherietoxin beim Menschen von seinem Immunitätszustande abhängig ist.

Wir haben bei diesen Versuchen erst auf dem Umwege des Tierexperimentes erfahren können, wieviel Schutzkörper im Kubik-

zentimeter Serum ein Individuum bei negativem Ausfalle der Reaktion enthält. Es war zu erwarten, daß wir auf anderem Wege imstande sein werden, ohne das Tierexperiment zum Ziele zu kommen. Bei unserer bisherigen Methodik nahmen wir das Serum des zu prüfenden Menschen, verdünnten dasselbe und bestimmten diejenige Verdünnung, welche die gleiche Menge einer Toxinverdünnung von bestimmter Konzentration beim Meerschweinchen neutralisierte. Wir können umgekehrt die Toxinverdünnung in ihrer Konzentration allmählich herabsetzen, immer mehr Diphtherietoxin beim Menschen intracutan injizieren, bis wir an diejenige Konzentration gelangen, die positive Reaktion eben auslöst. Das Erscheinen der positiven Reaktion wird uns anzeigen, daß das eingebrachte Diphtherietoxin durch den im Serum vorhandenen Schutzkörper nicht mehr völlig paralyisiert wird.

Wir konnten auf Grund unserer Bestimmungen sagen, daß jedes Individuum, welches auf 0,1 unserer Diphtherietoxinverdünnung 1 : 1000 negativ reagierte, mindestens Schutzkörper in der Menge von 0,031 IE. in 1 ccm besaß. Das Serum paralyisierte in einer Verdünnung von 1 : 10 die gleiche Menge einer Toxinverdünnung 1 : 500. Falls ein Serum auch noch in einer Verdünnung von 1 : 25 oder 1 : 50 oder 1 : 100 oder 1 : 200 usw. die gleiche Menge Toxinverdünnung im Meerschweinerversuch paralyisierte, war zu verlangen, daß das betreffende Individuum nicht bloß die intracutane Injektion von 0,1 einer Toxinverdünnung 1 : 1000 reaktionslos vertragen müßte, sondern dieselben Mengen einer geringeren Verdünnung.

Paralysierte das Serum noch in einer Verdünnung von 1 : 25 glatt die gleiche Menge einer Toxinverdünnung 1 : 500 beim Meerschweinchen, so mußte das betreffende Individuum mindestens die Injektion von 0,1 einer Toxinverdünnung 1 : 400 vertragen. Bei Wirksamkeit der Serumverdünnungen 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 usw. mußte die Injektion von 0,1 einer Toxinverdünnung 1 : 200 resp. 1 : 100 resp. 1 : 50 usw. reaktionslos vertragen werden.

Wir wählten zum ersten Versuche 2 Kinder, die intracutan mit 0,1 einer Toxinverdünnung 1 : 1000 injiziert, negativ reagiert hatten. Bei Untersuchung des Serums auf Schutzkörpergehalt ergab sich, daß das Serum noch in einer Verdünnung von 1 : 100 die gleiche Menge einer Toxinverdünnung 1 : 500 beim Meerschweinchen paralyisierte. In der Verdünnung des Serums 1 : 200 gelang die Paralyisierung nicht mehr.

Wir injizierten nun beiden Patienten intracutan 0,1 einer Diphtherie-

gehaltes menschlichen Serums durch intracutane Injektion von Diphtherietoxin. 351

toxinverdünnung 1 : 250. Keine Reaktion. Nach unseren theoretischen Überlegungen mußte mindestens 0,1 oder 1 : 100 noch reaktionslos vertragen werden. Dies war tatsächlich der Fall. Die Grenze war bei 1 : 50 zu erwarten. 0,1 von 1 : 50 erzeugte nun folgende Reaktion:

	nach 24 Std.	nach 48 Std.	3. Tag	4. Tag
Oscar K.	$\widehat{10}$	undeutlich	=	fast 0
Max B.	$\widetilde{10}$	reaktionslos	0	0

0,1 von 1 : 25 unseres Diphtherietoxins hatte folgende Reaktion zur Folge:

	nach 24 Std.	nach 48 Std.	3. Tag
Oscar K.	$\widehat{10}$	$\widetilde{8}$	undeutlich
Max B.	$\widetilde{10}$	etwas kleiner.	

Weitere Steigerung der Dosis nahmen wir nicht vor.

Wir wiederholten den Versuch an 4 weiteren Fällen, die intracutan mit 0,1 einer Toxinverdünnung 1 : 1000 injiziert negativ reagiert hatten. Da wir wußten, daß das Serum in der Verdünnung 1 : 10 sicher paralyisierte, begannen wir bei der Wertbestimmung des Serums am Meer-schweinchen gleich mit der Verdünnung des Serums 1 : 25.

Serumverdünnungen:

	1:25	1:50	1:100	1:200	1:300	1:400
Ko.	+	+	+	+	+	+
S.	+	+	+	+	+	+
Ka.	—	$\pm$	+	+	+	+
B.	—	—	+	+	+	+

Wir hatten also 2 Kinder, deren Schutzkörpergehalt zwischen den Werten von 1 : 10 und 1 : 25 lag (zwischen 0,031 und 0,07 IE. in 1 cem unverdünnten Serums), das 3. Kind hatte um fast zwei Stufen mehr Schutzkörper. Der Grenzwert war nahe der Verdünnung des Serums 1 : 50 (also nahe 0,15 IE. in 1 cem unverdünntem Serum). Das 4. Kind zeigte Schutzkörpergehalt zwischen den Verdünnungen 1 : 50 und 1 : 100 (d. i. zwischen 0,15 und 0,31 IE.).

Nach unserer Überlegung durften wir bei der Injektion der Kinder Ko. und S. mit Diphtherietoxin mit der Toxinmenge nicht wesentlich steigen. Bei Fall 3 war zu erwarten, daß 0,1 einer Verdünnung 1 : 100 reaktionslos vertragen wird, bei Fall 4 ebenfalls 0,1 einer Toxinverdünnung 1 : 100.

Das Ergebnis der Prüfung war folgendes:

	nach 24 Std.	48 Std.	72 Std.	
Ko.	1 : 800	$\tilde{12}^*)$	=	= also beide Verdünnungen + (Schutzkörpergehalt = ca. 0,0155 IE. in 1ccm unverdünnten Serums).
	1 : 400	$\tilde{14}$	=	=
S.	1 : 800	$\tilde{4}$	=	undeutlich
	1 : 400	$\tilde{6}$	=	= do.
B.	1 : 200	} reaktionslos		
	1 : 100			
	1 : 50			
	nach 24 Std.	48 Std.	72 Std.	Schutzkörpergehalt im ccm unverdünnten Serums
	1 : 25	$\tilde{5}(14)$	$\tilde{5}$	= pigment > 0,155 IE. < 0,31 „
Ka.	1 : 400	} reaktionslos		
	1 : 200			
	1 : 100			
	1 : 50			
	nach 24 Std.	48 Std.	72 Std.	
	1 : 25	$\tilde{6}(12)$	6 (Hof geschwunden)	pigment. > 0,155 IE. < 0,31 „

*) Die Zahl bedeutet den Durchmesser der Reaktion in mm.

— starkes Infiltrat, — starke Rötung.

~ schwaches „ ~ schwache „

Bei diesen Versuchen ergibt sich also die Bestätigung unserer theoretischen Vorstellung. Es war interessant zu sehen, daß die Grenzreaktion durch relative Kleinheit der Rötung und des Infiltrates gekennzeichnet war, daß der Hof rasch schwand und daß die Pigmentierung auffallend früh einsetzte. Steigerten wir die Dosis, so zeigte sich wenigstens bei der von uns verwendeten geringen Erhöhung der Dosis die Intensität der Reaktion nicht mehr verstärkt. Die Kleinheit der Reaktion, das rasche Verschwinden des Hofes und die Pigmentierung erinnerte an Reaktionen, die unter Antitoxineinfluß stehen.

Daß die Intensität der Reaktion bei Überschreiten des Grenzwertes nicht weiter zunimmt, erklären wir uns damit, daß bei Steigerung der Dosis der gesamte Schutzkörpergehalt des Organismus zur Neutralisierung herangezogen wird, der wohl das Entstehen der Reaktion nicht völlig unterdrücken kann, aber doch den Ablauf der Reaktion

in günstigem Sinne beeinflußt und sie zu rascherer Abheilung bringt. Wir können ja annehmen, daß ein Patient, dessen Serum in einer Verdünnung von 1 : 100 noch gleiche Mengen unserer Toxinverdünnung 1 : 500 beim Meerschwein paralysiert, die intracutane Injektion von 0,1 unserer Toxinverdünnung von 1 : 100 nicht nur an einer Hautstelle, sondern an vielen verschiedenen Hautstellen reaktionslos vertragen würde. Für die Frage der Bestimmung des Grenzwertes hat die Tatsache der fehlenden weiteren Steigerung der Reaktionsgröße bei steigender Toxinmenge keine wesentliche Bedeutung. Wir werden an dem Auftreten auch rasch abklingender Reaktion erkennen, daß wir beim Grenzwert angelangt sind.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß wir imstande sind, durch Prüfung der reaktionslos vertragenen Toxinmenge den ungefähren Gehalt des Serums an Schutzkörper gegen Diphtherietoxin am Menschen selbst zu bestimmen, indem wir von der größeren Verdünnung allmählich zu stärkeren Konzentrationen übergehen und die Toxinmenge dadurch solange steigern, bis wir eine Reaktion erhalten, die aus einer, nach 24 Stunden nach der Injektion nachweisbarer deutlicher Rötung und Infiltration besteht. Die Auswertung am Meerschweinchen ist nur zu dem Zwecke notwendig, um sich über die Wirksamkeit des verwendeten Diphtherietoxins einmal zu orientieren und die zu seiner Paralyse nötige Antitoxinmenge zu bestimmen. Wenn man dann zu den Auswertungsversuchen am Menschen eine Toxinmenge benützt, welche von der beim Meerschweinchen verwendeten gut wirksamen Menge nicht wesentlich abweicht, so gelten ungefähr die von uns gefundenen Zahlen. Um sicher zu gehen, kann man vor Durchführung der Bestimmungen einige negativ reagierende Fälle auf den Schutzkörpergehalt ihres Serums prüfen, um den minimalen Wert des Schutzkörpergehaltes bei negativer Reaktion des Menschen zu fixieren. Auf Grund der Kenntnis dieser Minimalzahl und der Wirksamkeit des Toxins lassen sich die weiteren Bestimmungen beim Menschen mit dem gleichen Toxin ohne Tierexperiment durchführen.

Noch eine weitere Lehre können wir aus den Ergebnissen unserer Versuchsreihe ziehen. Die Tatsache, daß die Grenzreaktionen kleiner ausfallen, und rascher verschwinden als Normalreaktionen, erinnert uns daran, daß ähnliche — man könnte sagen — Grenzreaktionen auch schon bei Injektion von 0,1 von einer Verdünnung unseres Diphtherie-

toxins 1 : 1000 zu beobachten sind. Wie wir gesehen, ist vollständig negativer Ausfall der Reaktion auf diese Menge bei einem Schutzkörpergehalt des Serums von mindestens 0,031 IE. im ccm zu erwarten, oder das Serum paralysiert noch in einer Verdünnung 1 : 10 die gleiche Menge einer Verdünnung unseres Toxins 1 : 500. Deutlich positiver Ausfall der Toxinreaktion ist mit Fehlen von Schutzkörpern verbunden. Die oben erwähnten rasch abklingenden Toxinreaktionen dürften bei denjenigen Individuen zustande kommen, die nur wenig Schutzkörper im Serum besitzen, also Individuen, deren Serum vielleicht nur in der Verdünnung 1 : 2 oder 1 : 5 gleiche Mengen unserer Diphtherietoxinverdünnung 1 : 500 zu paralysieren imstande ist.

Wien IX/2, Lazarethgasse 14, k. k. Universitäts-Kinderklinik.