IV. Aus dem hygienischen Institut der Universität
Greifswald.

**Ueber die Schutzkraft des Blutserums von
Diphtheriereconvalescenten und gesunden
Individuen gegen tödtliche Dosen von
Diphtheriebacillenculturen und Diphtherie-
bacillengift bei Meerschweinchen.**

Von Dr. Rudolf Abel, Privatdocenten und Assistenten.

Für eine Anzahl von Infectiouskrankheiten des Menschen, bei welchen wir uns das Zustandekommen der Heilung und der nachfolgenden Unempfänglichkeit für den specifischen Krankheitserreger in erster Linie durch die Production von Antikörpern hervorgebracht denken müssen, ist der Beweis geliefert worden, dass das Blutserum der Reconvalescenten Versuchsthiere gegen die Erreger der überstandenen Erkrankung zu immunisiren vermag. So für die Pneumonie von Klemperer, für die Cholera von Lazarus, Klemperer und besonders genau von R. Pfeiffer und Issaëff, für den Typhus von R. Stern und von E. Neisser.

Hinsichtlich der Diphtherie, bei welcher die Verhältnisse ähnlich liegen, sind von Klemensiewicz und Escherich¹⁾ Untersuchungen in derselben Richtung angestellt worden, die sich allerdings nur auf zwei Fälle erstrecken. Die Resultate dieser Studien waren folgende:

Fall 1. Einem neunjährigen Kinde, welches eine leichte Diphtherie durchgemacht hat, wird 23 Tage nach dem Schwinden der Rachenbeläge mittels Aderlasses Blut entzogen. Von dem defibrinirten Blute erhalten zwei Meerschweinchen intraperitoneal 5,5 bzw. 3,8 ccm. Am nächsten Tage werden dieselben mit Diphtheriebouilloncultur subcutan inficirt; sie überstehen diese Impfung reactionslos, während zwei mit gleichen Culturmengen inficirte Controllmeerschweinchen nach 8 und 19 Tagen eingehen. Neun Tage später werden beide Serumthiere subcutan mit geringen Quantitäten Diphtheriebouilloncultur inficirt. Beide bleiben nach leichter Reaction am Leben, aber auch das Controllthier übersteht die Infection. Abermals neun Tage später erneute Infection beider Thiere mit grösseren Culturdosen. Serumthier 1 überlebt unter Reaction mit Infiltratbildung an der Impfstelle, geht aber bei einer weiteren, 21 Tage darauf erfolgenden Infection mit einer hohen Dosis vollvirulenter Cultur in 30 Stunden ein. Serumthier 2 bekommt ein starkes Infiltrat, erhält darauf von dem Blutserum des unten beschriebenen Falles 2 2,8 ccm injicirt und bleibt am Leben. Ein Controllthier, welches verhältnissmässig viel geringere Culturmengen als die Serummeerschweinchen erhalten hatte, magert stark ab und stirbt nach 39 Tagen an Pneumonie.

Fall 2. Einem fünfjährigen Kinde, welches eine schwere Diphtherie durchgemacht hat (Tracheotomie) wird mittels Aderlasses Blut entzogen, und zwar neun Tage nach dem Schwinden der Beläge. Von dem Serum erhalten drei Meerschweinchen 1,2 und 3 ccm intraperitoneal. Die beiden ersten Thiere ertragen ganz reactionslos die am nächsten Tage erfolgende subcutane Infection mit Mengen von Diphtheriebouilloncultur, welche gleich schwere Controllmeerschweinchen in 131, bzw. 36 Stunden tödten. Eine 13 Tage darauf ausgeführte Impfung mit grossen Dosen Bouilloncultur (etwa dem zwei- und fünffachen der für Controllthiere tödtlichen Dosis) führt ihren Tod in 24 und 32 Stunden herbei. Das dritte Meerschweinchen, welches 3 ccm Serum erhalten hatte, erträgt reactionslos die zwei Tage darauf erfolgende Infection mit (mindestens) der zweifachen für Controllthiere tödtlichen Dosis Diphtheriebouilloncultur, geht aber schnell auf die einen Monat später erfolgende Impfung mit einer verhältnissmässig grossen Menge Diphtheriebouilloncultur zugrunde.

¹⁾ Klemensiewicz und Escherich, Ueber einen Schutzkörper im Blute der von Diphtherie geheilten Menschen. Centralblatt für Bacteriologie Bd 13, S. 153.

Aus diesen Versuchen leiten die Verfasser die gewiss richtige Folgerung ab, dass das Serum der beiden Patienten die Fähigkeit besessen hat, Meerschweinchen gegen eine tödtliche Infection mit Diphtheriecultur zu schützen. Da sich bei Versuchen mit dem Blutserum von gesunden Menschen eine Schutzkraft desselben nicht zeigte, — nähere Angaben über derartige Versuche sind leider nicht gemacht worden — so schliessen sie weiter, dass schützende Wirkung gegen Diphtherieinfection „dem menschlichen Blute als solchem nicht zukommt, sondern erst durch das Ueberstehen des diphtheritischen Infectionsprocesses erworben wird.“

Die Verfasser ziehen dann weiter aus dem Sterben der Meerschweinchen in Versuch 2 auf eine 13 Tage nach der überstandenen ersten Impfung erfolgende zweite Infection den Schluss, dass die schützende Wirkung des Serums im Thierkörper bei den zur Anwendung gekommenen Dosen nach 14 Tagen verschwunden war. Dieser Folgerung ist nicht ohne weiteres zuzustimmen. Um ein sicheres Urtheil über die Dauer der durch das Serum hervorgerufenen Schutzwirkung zu haben, hätte man eine Anzahl von Thieren ein, zwei, drei Wochen u. s. w. nach der Injection gleicher Serumengen zum ersten male mit Diphtherie inficiren müssen. Bekommen die Meerschweinchen aber am Tage nach der Serumgabe eine Diphtheriedosis, wie in den Versuchen der Verfasser, so ist damit ihre Rolle ausgespielt, was die Beurtheilung der Serumwirkung betrifft. Der tödtliche Effect einer 14 Tage später erfolgenden zweiten Infection kann sich dadurch erklären, dass schon bei der ersten Infection die ganze durch das Serum hervorgerufene passive Immunität aufgebraucht worden ist. Ein etwaiges Ueberstehen der zweiten Infection brauchte andererseits nicht auf Rechnung der Serumwirkung allein geschoben zu werden, könnte vielmehr auch so erklärt werden, dass eine active Production von Antikörpern durch das Ueberstehen der ersten Infection veranlasst worden war, was bekanntlich nicht immer, aber doch bisweilen thatsächlich der Fall ist. Die Verfasser begehen mit ihrer Deutung einen Fehler, welcher sich aus der Nichtbeachtung des „ne bis in idem“ ergibt, ähnlich wie Tizzoni und Centanni bei ihren Versuchen über die Vererbung der Rabiesimmunität.¹⁾ Es giebt nur eine Möglichkeit, um bei wiederholter Impfung einigermaßen sichere Urtheile über die Wirkungskdauer des injicirten Serums zu erhalten; man muss gleich schwere Thiere ganz in der gleichen Weise mit Diphtherie behandeln und nur die Serumdosis variiren. An der Hand eines Versuches wird diese Möglichkeit weiter unten erläutert werden.

Fassen wir die von Klemensiewicz und Escherich erarbeiteten Resultate zusammen, so zeigten dieselben, dass dem Serum von Diphtheriereconvalescenten 9, respective 23 Tage nach Ablauf der Erkrankung eine bezüglich des Serums gesunder erwachsener Personen nicht nachweisbare Schutzwirkung gegen den Effect künstlicher Diphtherieinfection beim Meerschweinchen zukam. Ueber die Höhe der Schutzwirkung und über die Dauer derselben vermögen uns die Versuche keine sicheren Aufschlüsse zu liefern.

Die besprochene Arbeit von Klemensiewicz und Escherich enthielt meines Wissens die einzigen in der Litteratur vorhandenen Angaben über das Immunisirungsvermögen des Blutserums von Diphtheriereconvalescenten, als ich im Februar 1894 die Möglichkeit gewann, gelegentlich einer in Greifswald herrschenden Diphtherieepidemie Beobachtungen über denselben Gegenstand anzustellen.

Meine Untersuchungen sollten folgende Fragen zu beantworten versuchen:

1. Besitzt das Serum von Diphtheriereconvalescenten schützende Eigenschaft gegen Diphtherieinfection, resp. Diphtheriegiftwirkung bei Meerschweinchen? Die zwei in der Arbeit von Escherich und Klemensiewicz bearbeiteten Fälle genügten für die Beurtheilung dieser Frage jedenfalls noch nicht.

2. Wie lange nach überstandener Krankheit tritt diese Schutzwirkung auf, wie lange hält sie an und wie stark ist sie?

3. Kommt vielleicht eine Schutzkraft auch dem Blutserum gesunder Individuen zu, welche nie diphtheriekrank waren; wenn dies der Fall ist, unterscheidet sich die Höhe dieser natürlich vorhandenen Immunität von der durch Ueberstehen einer Diphtherie gewonnenen?

Ich bin nun jetzt, wo ich meine Studien der Oeffentlichkeit übergebe, weit davon entfernt, diese Fragen gelöst zu haben. Es stellte sich sehr bald heraus, dass Untersuchungen in dem geplanten Umfange durchzuführen unmöglich war. Da dem Institute Krankematerial leider nicht zur Verfügung steht, so machte es grosse Mühe, Diphtheriereconvalescenten zu finden, welche bereit waren, sich Blutentziehungen machen zu lassen. Aus begreiflichen Gründen konnten fast nur Erwachsene untersucht werden. Ader-

lasse zu machen, wurde von denselben niemals gestattet, nur Schröpfköpfe zu setzen wurde erlaubt, so dass also nur geringe Quantitäten Blut zur Verfügung standen. Ferner war es nicht möglich, die Patienten für eine beliebig bestimmte Zeit nach Ablauf der Erkrankung zur Blutentnahme zu bekommen oder demselben Individuum zu verschiedenen Zeiten Blut zu entnehmen. Deshalb konnte nicht das Nacheinander des Immunisirungsverlaufes an einem Kranken studirt werden, sondern nur durch Beobachtung einer Reihe von Kranken zu verschiedenen Zeiten nach Ablauf der Krankheit ein Anhalt bezüglich desselben gewonnen werden, wodurch natürlich nicht so zuverlässige Resultate wie bei fortgesetzter Beobachtung desselben Kranken erzielt werden konnten. Ich blieb eben überall von dem guten Willen der Patienten abhängig, der selbst mit klingenden Ueberredungsmitteln nicht immer in die gewünschten Bahnen zu lenken war.

Dass ich es wage, meine Untersuchungen trotz ihrer mir wohl bewussten Unvollständigkeit zu publiciren, hat zwei Gründe. Erstens glaube ich, dass dieselben doch zur Beantwortung der aufgeworfenen Fragen einige nicht unerhebliche und nicht uninteressante Beiträge zu liefern und damit anderen Untersuchern, welche, auf ein eigenes Krankenmaterial gestützt, den Fragen näher treten wollen, eine gewisse Grundlage zu bieten vermögen. Zweitens aber werde ich, infolge des Zurückgehens der hiesigen Diphtherieepidemie voraussichtlich nicht mehr in der Lage sein, weitere Studien über den Gegenstand machen zu können.

Das zu den Untersuchungen nöthige Blutserum wurde auf folgende Weise gewonnen: Der Rücken des Patienten wurde zwischen den Schulterblättern mit Wasser und Seife, dann mit Sublimatlösung, darauf mit Alkohol und endlich mit Aether gereinigt und desinficirt. Darauf wurden 1—3 Schröpfköpfe, welche nebst Wattebausch im Trockenschranke vorschriftsmässig sterilisirt worden waren, gesetzt: in denselben wurde der luftverdünnte Raum nicht, wie es vielfach in der Praxis geschieht, durch Eintauchen der Schröpfköpfe in kühles Wasser und durch Ausbrennen mit einem Tropfen Spiritus, sondern, um jede Spur fremder Flüssigkeit fern zu halten, nur durch Erwärmen über einer Flamme erzeugt. Zum Scarificiren diente ein durch Begiessen und Abbrennen mit Alkohol sterilisirter Schnepfer, nach dessen Anwendung die schon vorher benutzten Schröpfköpfe wieder gesetzt wurden. Nach dem Aufhören der Blutung wurden die Schröpfköpfe mit den inzwischen in einer sterilen Schale aufbewahrten Wattebäuschen wieder geschlossen und 24 Stunden lang im Keller bei circa 10° aufbewahrt. Dann hatte sich ein meist völlig klares Serum abgeschieden.

Bestimmte Mengen von dem Serum wurden darauf Meerschweinchen intraperitoneal oder subcutan beigebracht. Die Thiere vertrugen selbst beträchtliche Dosen, mehrere Cubikcentimeter, anstandslos; nur bei einem Thiere trat eine Infection an der Injectionstelle auf. Bisweilen war es nöthig, wenn nur wenig Serum gewonnen war, eine blutig tingirte Flüssigkeit zu injiciren.

Gleichzeitig mit der Serum injection oder 24 oder 48 (einmal auch 72) Stunden später wurde den Meerschweinchen die Diphtherieinjection gemacht. Dieselbe wurde immer subcutan in der Bauchgegend vorgenommen, und zwar, wenn das Serum ebenfalls subcutan eingespritzt worden war, an der entgegengesetzten Körperseite, um beurtheilen zu können, ob eine etwa eintretende Infiltration dem Serum oder der Diphtherie zur Last zu legen wäre. Als Impfmateriel wurden entweder Diphtheriebouillonculturen oder ein aus denselben gewonnenes Gift benutzt. Die verwendeten Diphtherieculturen stammten alle von derselben Bacillenrace. Es wurden stets 48stündige Bouillonculturen gebraucht, deren Virulenz während der Dauer der Untersuchungen leichten Schwankungen unterlag, so dass die Dosis letalis minima zwischen 0,01 und 0,02 ccm pro 500 g Meerschweinchen variirte. Es war darum nöthig, stets bei den Versuchen über die Wirksamkeit des Serums Controllthiere zu verwenden und auch häufig die geringste tödtliche Dosis zu bestimmen. Auf der Tabelle S. 901 sind die Controllthiere nicht aufgeführt worden, um die Uebersicht nicht unnöthig zu erschweren; bei jedem Versuchsthier ist aber angegeben, um wie viel mal die ihm gegebene Culturmenge die für Thiere seiner Grösse sicher tödtliche Dosis übertrifft. Es mag noch besonders erwähnt sein, dass in der Tabelle die Versuche mit mehreren Serumarten aus dem Grunde als nicht beweisend fortgelassen worden sind, weil die Infection der Controllthiere nicht ein ganz unzweifelhaftes Resultat ergeben hatte.

Da das Diphtheriegift quoad infectionem viel eher eine Grösse von constanter Wirksamkeit darstellt als die lebende Cultur, so wurde solches für eine Anzahl von Versuchen herangezogen. Mit Absicht wurde es nicht ausschliesslich verwendet, da die Möglichkeit vorlag, dass das Serum den lebenden Bacillen sich anders als dem Gifte gegenüber verhalten könnte. Das Diphtheriegift bestand aus zwei Wochen alter Bouilloncultur, welche nach Zusatz von

¹⁾ Vergleiche Ehrlich und Hübener, Ueber die Vererbung der Immunität bei Tetanus. Zeitschr. f. Hygiene Bd. 18. S. 56.

Tabelle I. Ergebnisse der Untersuchung des Blutserums von Diphtheriereconvalescenten.

No.	Bemerkungen über den Patienten und die Krankheit	Blut-entnahme am wievielten Tage nach der Krankheit	Gewicht der Meer-schwein-chen	Injicirte Serummenge, Injections-stelle	Termin der Diphtherie-injection im Verhältniss zur Serum-ein-spritzung	Art des Infections-materials	Dosis des Diphtheriematerials		Verlauf der Diphtherieinjection	Bemerkungen.
							absolut	das wie-vielfache der tödtlichen Dosis		
1	19-jähriger Mann. Schwerer Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	zweiten	280 g	0,7 ccm subcutan	2 Tage später	Bouilloncultur	0,02 ccm	4	Tod nach 60 Stunden	
2	20-jähriges Mädchen. Leichter Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	vierten	735 g	0,8 ccm intra-peritoneal	3 Tage später	Bouilloncultur	0,02 ccm	2,2	Tod nach 8½ Tagen	
3	20-jähriger Mann. Mittelschwerer Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	fünften	280 g	1,25 ccm subcutan	2 Tage später	Bouilloncultur	0,02 ccm	4	Tod nach 5½ Tagen	
4	22-jähriger Mann. Leichter Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	sechsten	540 g	0,8 ccm subcutan	2 Tage später	Bouilloncultur	0,015 ccm	1,5	Tod nach 5 Tagen (siehe Bemerkung)	Das Thier hat nach zwei Tagen ein sehr grosses Infiltrat und wird in besonderer Weise behandelt, so dass sein Tod dadurch hinaus geschoben wird.
			450 g	1,4 ccm subcutan		Bouilloncultur	0,015 ccm	1,5	Tod nach 40 Stunden	
5	18-jähriges Mädchen. Leichter Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	achten	210 g	2,8 ccm subcutan	2 Tage später	Diphtheriegift	0,05 ccm	1,5	Keine Reaction	Thier No. 1 bekommt eine Infection an der Injectionsstelle; ca. einen Monat später inficirt, überlebt es ebenso aber auch das mit derselben Dosis inficirte Controlthier.
			200 g	0,2 ccm subcutan						
6	20-jähriger Mann. Leichter Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	neunten	285 g	1,6 ccm intra-peritoneal	1 Tag später	Diphtheriegift	0,06 ccm	1,05	Keine Reaction	
7	18-jähriger Mann. Leichter Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	neunten	250 g	4,1 ccm subcutan	1 Tag später	Diphtheriegift	0,05 ccm	1,2	Keine Reaction	
			250 g	1,5 ccm intra-peritoneal			0,05 ccm	1,2		
			245 g	0,55 ccm subcutan			0,05 ccm	1,2		
8	20-jähriger Mann. Mittelschwerer Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	neunten	200 g	0,65 ccm subcutan	1 Tag später	Diphtheriegift	0,05 ccm	1,5	Keine Reaction	
			210 g	0,2 ccm subcutan			0,05 ccm	1,4	Starkes Infiltrat, nach 14 Tagen abgestossen. Tod nach 33 Tagen an Marasmus. Gewicht 160 g.	
9	20-jähriger Mann. Mittelschwerer Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	zehnten	285 g	1,4 ccm subcutan	1 Tag später	Diphtheriegift	0,06 ccm	1,05	Tod nach 40 Stunden	
			300 g	0,7 ccm subcutan			0,06 ccm	1	Tod nach 40 Stunden	
10	20-jähriger Mann. Leichter Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	elften	360 g	3,2 ccm subcutan	1 Tag später	Diphtheriegift	0,07 ccm	1	Keine Reaction	
			290 g	2,0 ccm subcutan			0,06 ccm	1,03		
11	23-jähriger Mann. Sehr schwerer Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	ca. 1½ Monate	860 g	1 ccm intra-peritoneal	2 Tage später	Bouilloncultur	0,02 ccm	1,5	Tod nach 4 Tagen	
12	35-jähriger Mann. Schwerer Fall. Diphtheriebacillen gefunden.	ca. 2 Monate	430 g	0,6 ccm subcutan			0,02 ccm	2	2-Markstückgrosses Infiltrat. Ueberlebt.	
			320 g	0,5 ccm subcutan	2 Tage später	Bouilloncultur	0,05 ccm	4	Tod nach 36 Stunden	
			380 g	1,0 ccm subcutan	2 Tage später		0,05 ccm	3,3	Tod nach 50 Stunden	
			575 g	1,5 ccm intra-peritoneal	Gleichzeitig		0,05 ccm	2,2	Tod nach 42 Stunden	
13	30-jähriger Mann. Schwerer Fall. Starke Lähmungen.	ca. 2½ Monate	635 g	1,6 ccm subcutan	1 Tag später	Bouilloncultur	0,02 ccm	2	Tod nach 48 Stunden	
			628 g	2,5 ccm subcutan			0,02 ccm	2	Starkes Infiltrat, nach 10 Tagen sich abstossend. Ueberlebt.	
14	12-jähriges Mädchen. Schwerer Fall.	ca. 5 Monate	180 g	1,0 ccm subcutan	2 Tage später	Bouilloncultur	0,012 ccm	2	Keine Reaction	Das den Thieren No. 3 und 4 injicirte Serum hat 5 Tage kalt gestanden.
			180 g	1,0 ccm subcutan			0,03 ccm	5		
			340 g	0,5 ccm subcutan			0,02 ccm	1,6		
			350 g	1,0 ccm subcutan			0,02 ccm	1,6		

$\frac{1}{2}$ 0/0 Carbolsäure keimfrei filtrirt worden war. Von dem Filtrat war die minimale tödtliche Menge für 500 g Meerschweinchen 0,0833 ccm.

Die Tabelle No. I (S. 901) giebt die bei der Untersuchung des Serums von Diphtheriereconvalescenten erhaltenen Resultate wieder. Die studirten 14 Fälle sind gemäss der Zeitdauer geordnet worden, welche vom Ablauf der Erkrankung bis zum Tage der Blutentziehung verstrichen war. Als Termin des Ablaufes der Erkrankung habe ich den Zeitpunkt gerechnet, an welchem die Beläge völlig aus dem Rachen verschwunden waren. In Fall 1—12 ist der Beweis für die echte diphtherische Natur der überstandenen Krankheit durch den Nachweis von Diphtheriebacillen mittels des Culturverfahrens erbracht worden. Fall 13 war durch schwere diphtherische Lähmungen charakterisirt, Fall 14 soll nach Angabe des behandelnden Arztes unzweifelhafte Diphtherie gewesen sein.

Betrachtet man die Resultate, welche die Seruminjectionen gehabt haben, so fällt zunächst auf, dass in dem ersten bis vierten Falle, d. h. vom zweiten bis sechsten Tage nach Ablauf der Erkrankung eine schützende Wirkung sich nicht bemerkbar macht. Das zwischen dem achten und elften Tage nach Ablauf der Diphtherie gewonnene Serum (Fall 5—10) zeigt dagegen in fünf von sechs Fällen deutlich schützende Kraft. Im nächsten Fall (11) waren leider bereits $1\frac{1}{2}$ Monate nach vollkommener Heilung zur Zeit der Untersuchung verstrichen, wodurch eine Lücke im Beobachtungszeitraum entsteht. Dem Serum dieses Patienten wohnt vielleicht noch etwas Schutzvermögen inne, ebenso dem des Falles 13. Bei No. 12 ist keinerlei Schutzkraft zu erkennen, bei No. 14 ist dieselbe aber wieder in hohem Maasse vorhanden.

Nach diesem Ueberblick über die Tabelle würde das Urtheil dahin abzugeben sein, dass das Blutserum von Diphtheriereconvalescenten bis zum sechsten Tage nach Ablauf der Infection keine Schutzwirkung äusserte; dass es vom achten bis elften Tage an in der Mehrzahl der Fälle eine solche erkennen liess, dass es nach Verlauf von Monaten dieselbe, aber nur noch in vermindertem Maasse oder gar nicht, nur vereinzelt noch vollkommen zu besitzen schien.

(Schluss folgt.)