III. Aus dem Institut für Infectionskrankheiten in Berlin.
(Director: Geh. Med.-Rath Prof. Dr. R. Koch.)

Ueber Schutzimpfungen gegen Cholera und Typhus mit conservirtem Impfstoff.

Von Prof. Dr. **R. Pfeiffer** und Dr. **Marx**.

Wenn die Möglichkeit vorhanden sein soll, Schutzimpfungen gegen Cholera und Typhus zur Zeit von Epidemien oder im Kriege mit Erfolg durchzuführen, so ist es unumgänglich nothwendig, Methoden zu finden, welche geeignet sind, zu diesem Zwecke dargestellte Impfstoffe zu conserviren. Es würde dies den grossen Vortheil haben, dass in völlig gleichmässiger und exacter Weise in einer Centralstelle die Impfstoffe im grossen Maassstabe dargestellt und versandt werden könnten.

Die von Pfeiffer und Kolle seiner Zeit angegebene Methode der Immunisirung von Menschen gegen Typhus besteht bekanntlich darin, dass 2 mg abgetödteter 18stündiger Typhusagarcultur sub-

cutan injicirt werden. Es tritt dann eine schnell vorübergehende Temperatursteigerung bis auf $38,5^{\circ}$ auf, und stellen sich mässige subjective Beschwerden, wie Kopfschmerzen und Appetitlosigkeit ein. Nach zehn Tagen hat sich das Blut der Schutzgeimpften in der Art verändert, dass das Serum, welches vor der Schutzimpfung keinen Einfluss in Dosen von 0,3 und darüber auf Typhusbacillen im Peritoneum des Meerschweinchens ausübte, nun in Dosen von 0,01 bis 0,075 bacillenaflösend und demgemäss schützend wirkte. Es hatte somit die Eigenschaften von Serum solcher Menschen angenommen, die eine Typhusinfektion überstanden haben.

Bevor wir jedoch Schutzimpfungen mit conservirtem Impfstoff an Menschen ausführten, war es nothwendig, im Thierexperiment die zweckmässigste Methode der Conservirung festzulegen. Unsere Thierversuche erstreckten sich auf die Conservirung von Typhus- und Choleraimpfstoff, und zum Experiment wurden Kaninchen benutzt. Die Immunisierungsmethode war die schon von uns früher mitgetheilte.¹⁾ Jedes zu immunisirende Kaninchen erhielt je drei Agarculturen 18stündiger Typhus- oder Choleraagarcultur, die in 5 ccm Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und eine Stunde in einem auf 70° eingestellten Wärmeschrank gehalten waren, subcutan an zwei Stellen des Rückens injicirt.

I. Conservirung von Typhusimpfstoff.

Es wurden sechs Dosen von Impfstoff dargestellt. Von diesen wurde No. 1, 4, 5 und 6 nach der Sterilisirung bei 70° mit 0,5% Phenol versetzt. No. 2 wurde in der Weise dargestellt, dass zur Aufschwemmung der Culturen nicht Kochsalzlösung, sondern eine 50%ige Glycerinlösung benutzt wurde. No. 3 wurde in gewöhnlicher Weise dargestellt und ohne jeden Zusatz zur Controlle aufbewahrt.

Mit den Präparaten 1—3 wurden am Tage der Darstellung gleichzeitig drei Kaninchen vorgehandelt. Das Resultat der Serumprüfung dieser drei Thiere ergibt folgende Tabelle.

Tage nach der Präventivimpfung	Titre des Serums		
	Kaninchen 1 (Impfstoff mit Phenolzusatz)	Kaninchen 2 (Impfstoff mit Glycerinzusatz)	Kaninchen 3 (Impfstoff ohne jeden Zusatz)
6 Tage	unter 0,1	unter 0,1	unter 0,1
13 Tage	unter 0,01	0,05	unter 0,01

Es ist also ersichtlich, dass der Phenolzusatz dem Impfstoff nicht geschadet hat. Bei Kaninchen 1 findet sich sowohl am 6. wie am 13. Tage derselbe Serumwerth wie bei dem Kontrollkaninchen, Kaninchen 3. Anders verhält es sich jedoch mit dem Thier, welches das mit Glycerin versetzte Präparat erhalten hatte. Auch hier entfaltete dasselbe eine deutliche immunisirende Wirkung, doch bleibt dieselbe weit hinter der des mit Phenol conservirten und des unconservirten Präparates zurück.

Hiermit war nun zwar entschieden, dass eine kurze Einwirkung von Phenol in keiner Weise auf die im Impfstoff befindlichen immunitätszeugenden Substanzen einen schädigenden Einfluss ausübt, doch musste nun noch erprobt werden, wie sich diese Körper einer länger dauernden Einwirkung der Carbonsäure gegenüber verhielten.

Das gleichzeitig mit den Präparaten 1—3 dargestellte Präparat 4 wurde einen Monat, und zwar vom 15. April bis 19. Mai dieses Jahres, im Zimmer gehalten. Nach dieser Zeit zeigte es sich völlig klar, und die abgetödteten Bacillen waren zu Boden gesunken. Mit diesem einen Monat lang bei gleichzeitigem Phenolzusatz conservirten Impfstoff wurde ein neues Kaninchen immunisirt.

Schon sieben Tage nach der Präventivimpfung erzielten wir mit 0,01 Serum einen vollständigen Schutz gegen eine Oese unseres ausserordentlich virulenten, in der Dosis von $1/50$ -Oese tödtenden Typhusbacillus. Also auch eine einen Monat lange Einwirkung der Carbonsäure bei Zimmertemperatur hatte dem Impfstoff in seiner Güte keinen Abbruch gethan.

Noch länger conservirten wir das Präparat No. 5. Das Phenolpräparat wurde vom 15. April bis 30. April bei Zimmertemperatur gehalten, dann vom 30. April bis 2. Juni im Brutschrank bei 37° . Die Gesamtdauer der Phenoleinwirkung betrug mithin $1\frac{1}{2}$ Monate. Trotz dieser langen Dauer der Conservirung und 32 Tage langer Einwirkung der Carbonsäure bei Brüttemperatur war auch die Wirksamkeit dieses Impfstoffes nicht geschädigt, da ein mit diesem Präparat immunisirtes Kaninchen am siebenten Tage ein Serum, das in der Dosis von 0,01 glatt schützte, lieferte.

¹⁾ Deutsche medicinische Wochenschrift 1898, No. 3.

II. Conservirung von Choleraimpfstoff.

In analoger Weise, wie wir hier festgestellt haben, dass es sehr wohl möglich ist, durch Zusatz von 0,5% Phenol den Typhusimpfstoff zu conserviren, stellten wir Versuche zur Conservirung von Choleraimpfstoff an.

Wir bereiteten uns vier Dosen Choleraimpfstoff in folgender Weise: Die Präparate 1, 2 und 4 wurden nach der Sterilisirung bei 70° mit 0,5% Phenol versetzt. Bei der Darstellung von Präparat 3 wurden die Choleraaculturen gleich in 0,5% Phenollösung aufgeschwemmt und dann eine Stunde bei 70° gehalten. Ein Controllversuch wurde hier nicht gemacht, da uns die Erfahrungen über circa 50 gegen Cholera immunisirte Kaninchen zu Gebote standen. Aus diesen Versuchen hatte sich ergeben, dass nach 4×24 Stunden ein Serumwerth von 1—3 mg erzielt wurde, der in den folgenden Tagen auf $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ bis $\frac{1}{20}$ mg steigt.

Folgende Tabelle giebt die Uebersicht über drei Thiere, die mit den Präparaten 1—3 gleich nach der Zubereitung des Impfstoffes geimpft worden waren.

Tage nach der Präventivimpfung	Titre des Serums		
	Kaninchen 1 (Impfstoff mit Phenolzusatz)	Kaninchen 2 (Impfstoff mit Phenolzusatz)	Kaninchen 3 (Impfstoff mit Phenollösung dargestellt)
4 Tage	1—2 mg	1—2 mg	2 mg

Alle drei Thiere zeigen also fast ganz gleiche Werthe ihres Serums, und zwar in der Höhe, wie sie zu erwarten war. Der nachträgliche Phenolzusatz hatte demnach in keiner Weise eine schädigende Wirkung ausgeübt, und es erwies sich sogar das Serum des Thieres, dessen Impfstoff gleich mit Phenollösung aufgeschwemmt war, kaum unwirksamer, als das der beiden anderen Thiere, trotzdem die Carbonsäure hier eine Stunde bei 70° eingewirkt hatte.

Diesen Versuchen schlossen wir noch einen Versuch mit einem längere Zeit conservirten Phenolpräparat, No. 4, an. Dies Präparat wurde vom 14. April bis 3. Mai im Zimmer gehalten und verblieb dann vom 3. Mai bis 2. Juni im Brutschrank, um dann erst einem Kaninchen injicirt zu werden. Das am vierten Tage entnommene Serum zeigte sich nicht so hochwerthig, wie das der anderen Kaninchen, der Werth lag am vierten Tage zwischen 5 und 10 mg. Dass es sich hier jedoch nur um einen individuellen Unterschied in der Zeit des Auftretens der Antikörper im Serum handelte, ein Unterschied, wie er gelegentlich auch sonst beobachtet wurde, bewies die Prüfung des am siebenten Tage entnommenen Serums. Jetzt war der Werth erheblich gestiegen und lag unter $\frac{1}{4}$ mg, so dass er durchaus den normalen Verhältnissen entsprach.

III. Immunisirung von Menschen mit conservirtem Typhusimpfstoff.

Nachdem es so sichergestellt war, dass ein durch Phenolzusatz von 0,5% conservirter Typhus- und Choleraimpfstoff durchaus in seiner Immunität hervorrufoenden Eigenschaft dem frisch bereiteten entsprach, gingen wir zur Immunisirung von Menschen gegen Typhus mit conservirtem Impfstoff über.

Drei kürzlich in das Institut neu eingetretene Diener, bei denen sich anamnestisch Typhus sicher ausschliessen liess, wurden behufs Immunisirung ausgewählt. Das Immunisiren der Diener gegen Typhus ist eine Vorsichtsmaassregel, die uns, nachdem mehrere Fälle schwerer Laboratoriumsinfektion mit Typhus vorgekommen waren, sehr nahe gelegt war.

Zur Immunisirung diente uns das schon erwähnte Präparat No. 6. Dieses war am 15. April dieses Jahres in der üblichen, besprochenen Weise aus drei Agarculturen dargestellt und hatte zur Conservirung einen Zusatz von 0,5% Phenol erhalten. Vom 15. April bis 30. Juni, also $2\frac{1}{2}$ Monat, war das Präparat in unseren sehr warmen Laboratoriumsräumen im Schrank aufbewahrt worden. Es hatte sich völlig geklärt, und die zu Boden gesunkenen todtten Keime füllten die Kuppe des Reagenzglases reichlich aus. Da jede Agarculture circa 20 mg Bacterienmasse liefert, so waren in den 5 ccm Flüssigkeit 60 mg Bacteriensubstanz enthalten. Es entsprachen 0,2 ungefähr der von Pfeiffer und Kolle benutzten Dosis von 2 mg Typhussubstanz. Die von uns zu gebende Menge war also 0,2, um unseren Versuch analog dem von Pfeiffer und Kolle mit frisch zubereitetem Vaccin zu machen.

Die Injection dieses Quantum des gut durchgeschüttelten Impfstoffes wurde am 30. Juni Mittags 2 Uhr an den Dienern A. St. und W. in der üblichen Weise unter die Rückenhaut ausgeführt. Schon nach wenigen Stunden stellten sich mässige Beschwerden ein. Unter Kopfschmerzen und gleichzeitiger Abge-

schlagenheit stieg die Temperatur noch am selben Abend bei allen Dienern bis auf 38° . Während W. sich am folgenden Tage, am 1. Juli, schon wieder völlig wohl fühlte und kaum noch eine Schmerzhaftigkeit der Injectionsstelle bestand, nahmen bei den anderen beiden nach einer etwas unruhigen Nacht die Kopfschmerzen im Verlauf des nächsten Tages noch zu, während die Temperatur sich auf 38° hielt. Um die Injectionsstelle herum war eine handtellergrösse, leichte Röthung und eine schmerzhaft geringe Anschwellung nachzuweisen. Gegen Mittag, also nach 24 Stunden, liessen auch bei A. und St. die Beschwerden nach, und die Temperatur ging bis auf $37,5$ zurück. Am folgenden Tage waren zugleich mit der Temperatursteigerung sämtliche subjectiven und objectiven Symptome verschwunden.

Diesen drei Dienern war zur controllirenden Serumprüfung am Tage vor der Injection mittels eines Schröpfkopfes Blut entnommen. Eine zweite Blutentnahme fand zehn, bzw. zwölf Tage nach der Schutzimpfung statt. Die Resultate der Serumprüfung sind folgende:

A.

Titre des Serums vor der Präventivimpfung $> 0,3$
 Titre des Serums 10 Tage nach der Präventivimpfung $0,05-0,025$.

St.

Titre des Serums vor der Präventivimpfung $> 0,3$
 Titre des Serums 10 Tage nach der Präventivimpfung . . . $0,025$.

W.

Titre des Serums vor der Präventivimpfung $> 0,3$
 Titre des Serums 12 Tage nach der Präventivimpfung $0,025-0,01$.

Da die von Pfeiffer und Kolle bei der Schutzimpfung mit frischem Impfstoff gefundenen Werthe, wie oben schon erwähnt, zwischen $0,01$ und $0,075$ geschwankt haben, so ist ersichtlich, dass die $2\frac{1}{2}$ Monat lang dauernde Conservirung eines Typhusimpfstoffes bei gleichzeitiger Einwirkung eines Zusatzes von $0,5\%$ Phenol in keiner Weise die immunisirenden Substanzen des Impfstoffes geschädigt hat.

Als bemerkenswerth ist noch zu berichten, dass das Serum keines der drei Behandelten nach der Schutzimpfung irgend wie erheblich agglutinirend wirkte. Das im Thierkörper stärkste Serum W. war völlig unwirksam, die Sera H. und St. agglutinierten erst nach längerem Stehen in der Verdünnung $1:5$ vollständig, das Serum H. liess auch noch in der Verdünnung $1:10$ Andeutung von Häufchenbildung erkennen.

Aus unseren Versuchen geht also klar hervor, dass Cholera- und Typhusimpfstoffe durch einen Zusatz von $0,5\%$ Phenol auf die Dauer von mindestens 4—10 Wochen conservirt werden können und dass auch die Einwirkung hoher Temperaturen, bis 37° , den Werth der Impfstoffe nicht beeinträchtigt.