Aus dem Laboratorium der Hydrotherapeutischen
Anstalt der Universität Berlin.
(Leiter: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. L. Brieger.)
**Weitere Versuche zur Darstellung spezifischer
Substanzen aus Bakterien.¹⁾**

II. Cholera Bazillen.

Von Dr. Martin Mayer.

Nachdem es Brieger und mir gelungen war, bei Typhusbazillen durch Aussalzen mit schwach alkalisiertem Ammoniumsulfat und darauffolgende Autolyse der Bakterien Substanzen zu gewinnen, die im Tierkörper (Kaninchen) Agglutinine von hohem Werte (bis 1:25 000) erzeugten, ohne jedoch dem Serum bakterizide Eigenschaften zu verleihen, wurden die Versuche mit dieser Methode auch auf Cholera bazillen ausgedehnt, da diese Bakterien gerade bezüglich der Gewinnung bakterizider Eigenschaften mehr versprochen. Denn sowohl nach Überstehen der natürlichen Cholerainfektion (Lazarus, Klemperer, Wassermann, Metchnikoff, Isaëff, Sobernheim etc.) als auch nach künstlicher Infizierung von Tieren mit Cholera, wie sie zuerst von Brieger, Kitasato und Wassermann angeführt wurde, zeigt das Blutserum hohe bakterizide Werte (Lazarus, Pfeiffer, Kolle, Salimbeni etc.). Zur Gewinnung hochwertiger Choleraimmunsera bediente man sich der Injektion lebender Bakterien, abgetöteter Kulturen und steriler Kulturfiltrate, welche letztere Methode insbesondere von französischen Autoren (Metchnikoff, Roux, Taurelli-Salimbeni, Courmont und Doyon) bevorzugt wurde,

weil man in diesen Filtraten die Gegenwart von Cholera toxinen vermutete.

Zu meinen Versuchen dienten als Ausgangsmaterial 24stündige Kulturen in Kolleschen Schalen; die Virulenz betrug $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{5}$ Öse. Zur jedesmaligen Verarbeitung kam die Wasseraufschwemmung von 7—10 Kulturschalen. Die Kulturen waren in der Hauptversuchsreihe von Herrn Dr. A. Schütze angelegt, der auch die diesbezüglichen Tierversuche im Institut für Infektionskrankheiten anstellte; er wird darüber selbst in der Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten berichten. — Die angewandte Methode selbst schloß sich im wesentlichen der früher von Brieger und mir¹⁾ geschilderten an. Bei der Verarbeitung zeigten sich jedoch gegenüber den bei Typhusbazillen gefundenen Tatsachen einige bemerkenswerte Unterschiede. Zunächst fand im Ammoniumsulfat eine spontane Säuerung meist nicht statt, sodaß ein Nachalkalisieren nur selten nötig war.

Nach achttägigem Verweilen der Bakterienaufschwemmung im Ammoniumsulfat wurde durch gehärtete, neutralisierte Filter abfiltriert, der Bakterienniederschlag abgepreßt und in 20—30 ccm destillierten Wassers aufgeschwemmt. Auch hierbei blieb die Reaktion meist alkalisch, anderenfalls wurde mit äußerst verdünnter Sodalösung schwach alkalisiert. Die Aufschwemmung wurde dann bei 37° der Autolyse überlassen; nach drei Tagen war diese meist vollständig, dabei hatte aber die Flüssigkeit meist eine äußerst zähe, fast gelatinöse Beschaffenheit angenommen, wie sie bei Typhusbazillen nie beobachtet war. Nach mehrmaligem Zentrifugieren wurde die, eventuell noch verdünnte, Flüssigkeit teils durch Pukalfilter filtriert, teils unfiltriert benutzt, nachdem kulturell keine lebenden Bakterien und im mikroskopischen Präparate keine sichtbaren Teile von Bakterienleibern mehr nachweisbar waren. Nach Injektion dieser Bakterienauszüge erhielt Schütze bei Kaninchen hohe bakterizide und verhältnismäßig geringe agglutinierende Eigenschaften der Sera. Auch hier zeigte sich wie bei den früheren Versuchen mit Typhus, daß bei der Filtration durch Pukalfilter ein Teil der wirksamen Substanzen zweifellos zurückgehalten wird, da in der betreffenden Versuchsreihe bedeutend geringere Werte erzielt wurden.

Der höchste erreichte Titer der bakteriziden Wirkung war in einem Falle 0,00001 ccm = $\frac{1}{100000}$. Ähnlich hohe Werte erhielten bisher nur Pfeiffer und Salimbeni, ersterer bei einer Ziege einen Wert von 0,00004 ccm = $\frac{1}{25000}$ (nach Mitteilung von A. Wolff in der Berliner physiologischen Gesellschaft); letzterer bei einem Pferde nach 14monatlicher Behandlung mit 189 Kulturen einen Wert von 0,00005 ccm = $\frac{1}{20000}$. Dabei zeigte unser Bakterienextrakt keine auffallend toxische Wirkung und konnte in ziemlich rascher Folge injiziert werden.

Der Unterschied in den Resultaten mit der gleichen Methode zwischen Typhusbazillen und Cholera bazillen, nämlich in dem einen Falle hohe agglutinierende in dem anderen hohe bakterizide Eigenschaften im Serum zu erzeugen, entspricht ganz den bei Immunisierung mit Bakterienleibern selbst gemachten Erfahrungen. Wenn wir somit auch vermittelt unserer Methode des Aussalzens in Ammoniumsulfat und anschließender Autolyse die höchsten bakteriziden Werte im Blutserum erhielten, so war doch in Betracht zu ziehen, daß wir als Ausgangsmaterial eine sehr große Bakterienmasse (7—10 Kollesche Schalen) benutzten. Denn es ist bekannt, daß man mit ziemlich geringen Bakterienmengen bei Cholera beträchtlich hohe bakterizide Werte erreichen kann; so erhielt z. B. Pfeiffer durch Injektion eines Bruchteiles einer Öse Cholera kultur schon einen sehr hohen Titer. Es stellten daher Schütze und ich selbst mit anderen einfacheren Methoden und geringeren Bakterienmengen Versuche an; während Schütze an der oben zitierten Stelle selbst über seine Versuche berichten wird, sei hier auf meine Versuche noch näher eingegangen.

Es wurde außer der einfachen Autolyse lebender Bakterien in destilliertem Wasser bei 37° auf den Rat des Herrn Geheimrat Brieger noch der Versuch gemacht, ob nicht schon durch einfache mechanische Einwirkung, nämlich durch Schütteln im Schüttelapparat bei konstanter Zimmertemperatur (15°) den lebenden Cholera bazillen die im Tierkörper spezifisch wirkenden Substanzen entzogen werden könnten. Es gelang uns tatsächlich, sowohl durch sechsständiges, wie 48ständiges Schütteln lebender Bakterien solche Substanzen zu erhalten. Es wurden jedesmal von vier Agarröhrchen 24ständiger Cholera kulturen (von der Virulenz $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{10}$ Öse) die Bakterien entnommen und in 20 ccm destilliertem Wasser aufgeschwemmt; die Aufschwemmung wurde in einem kleinen Kolben, der vor Licht durch eine schwarze Papierhülle geschützt war, 6, bezw. 48 Stunden im Schüttelapparat bei 15° geschüttelt. Dann wurde durch Pukalfilter filtriert und je ein Kaninchen mit der Flüssigkeit behandelt. Ich habe absichtlich diese noch relativ grossen Bakterienmengen gewählt, da Kontrollversuche gezeigt hatten, daß wegen beträchtlicher

¹⁾ Siehe L. Brieger, diese Wochenschrift 1902, S. 477; A. Schütze, diese Wochenschrift 1902, S. 478; L. Brieger und M. Mayer, diese Wochenschrift 1903, S. 309.

¹⁾ l. c.

Verluste beim Filtrieren etc. das Arbeiten mit geringeren Mengen nicht zweckmäßig erscheint.

Kaninchen I (Gewicht 3080 g) erhält das nach 48stündigem Schütteln gewonnene Filtrat vom 21. Juni bis 13. Juli intravenös, im ganzen 30 ccm (inklusive Spülflüssigkeit). Blutentnahme am 23. Juli. — Das Serum agglutinierte Cholerabazillen noch in Verdünnung 1:200 komplett makroskopisch nach zweistündigem Aufenthalt bei 37°. Das Serum schützte noch Meerschweinchen gegen eine Öse $\frac{1}{6}$ virulenter Cholera in Verdünnung von 0,0001 ccm; also Titer = $\frac{1}{10000}$.

Kaninchen II (1810 g) erhält das durch sechsstündiges Schütteln gewonnene Filtrat, und zwar vom 24. Juni bis 2. Juli 11 ccm intravenös, dann wegen Thrombosierung der Ohrvenen vom 2. Juli bis 14. Juli 22 ccm subkutan, im ganzen 33 ccm. Blutentnahme am 23. Juli. Das Serum agglutiniert Cholerabazillen noch in Verdünnung von $\frac{1}{100}$ ccm komplett; $\frac{1}{200}$ inkomplett. Das Serum schützt gegen eine Öse ($\frac{1}{6}$ Öse virulent) Cholera im Pfeifferschen Versuch in der Verdünnung 0,001 ccm, Titer $\frac{1}{1000}$.

Es wurden ferner vier Kulturen nach unserer Methode 48 Stunden in Ammoniumsulfat gebracht, dann 48 Stunden bei 37° der Autolyse überlassen. Das Pukalfiltrat erhielt:

Kaninchen III (1250 g) vom 18. Juni bis 3. Juli intravenös, im ganzen 19 ccm Flüssigkeit. Blutentnahme am 10. Juli. Serum agglutiniert Cholera in Verdünnung $\frac{1}{80}$ komplett $\frac{1}{100}$ in Spuren; Serum schützt im Pfeifferschen Versuch nur in Verdünnung 0,001 = $\frac{1}{1000}$.

Kaninchen IV wird behandelt mit dem Filtrat, gewonnen durch Autolyse einer Aufschwemmung von vier Agarkulturen bei 37° in 48 Stunden. Das Tier (2020 g) erhält vom 15. Juli bis 26. Juli 27 ccm intravenös. Blutentnahme am 2. August. Das Serum agglutiniert Cholera in Verdünnung $\frac{1}{800}$ komplett. Das Serum schützt im Pfeifferschen Versuch in Verdünnung 0,00008 = Titer $\frac{1}{12000}$.

Bei sämtlichen Versuchen wurde zur Feststellung der bakteriziden Grenzwirkung im Meerschweinchenkörper, eine Stunde nach der Impfung der Bauchsaft entnommen. Blieb ein Kontrolltier am Leben, so wurde der ganze Versuch wiederholt.

Wir haben also bei den geschilderten Versuchen durch 48stündiges Schütteln von Cholerabazillen bei Zimmertemperatur ein Serum von dem Titer $\frac{1}{10000}$ erhalten, und schon durch sechsstündiges Schütteln wurde ein Wert von $\frac{1}{1000}$ erreicht. Ob es sich auch hierbei schon um autolytische Vorgänge oder bloß um eine Abspaltung der spezifischen Substanzen durch rein physikalische Wirkung handelt, läßt sich ohne weiteres noch nicht entscheiden. Erwähnt sei, daß in beiden Fällen noch bewegliche lebende Cholerabazillen nach dem Schütteln nachgewiesen wurden. Auf jeden Fall haben wir in dieser höchst einfachen Methode den Beweis, daß es bei Cholerabazillen auch ohne komplizierte Einwirkungen leicht gelingt, wirksame Substanzen im bakterienfreien Filtrat zu erhalten. — Das in dieser Reihe nach unserer Methode behandelte Tier erreichte nur einen geringen Wert, ein mit dem Filtrat nach zweitägiger Autolyse behandeltes einen ziemlich beträchtlichen. Daß die Tiere mit geringen Werten (II und III) von sehr niederem Gewicht waren, spricht sehr dafür, daß die Höhe des Titers auch wesentlich von dem Organismus des behandelten Tieres abhängt.

Es lassen sich also mit Filtraten, die aus Cholerabazillen durch die verschiedensten hier geschilderten Methoden gewonnen werden, leicht ziemlich hohe bakterizide Werte des Serums der damit behandelten Tiere (Kaninchen) erreichen. Schon durch einfaches Schütteln bei Zimmertemperatur während 6, bzw. 48 Stunden werden spezifische Substanzen aus lebenden Cholerabazillen abgespalten und finden sich in der filtrierten Suspensionsflüssigkeit.