III. Aus dem Laboratorium für chirurgische Pathologie und Therapie an der Kaiserlichen Universität Kiew.

Zur Immunitätsfrage und Blutserumtherapie gegen Cholerainfektion.

Von Prof. Dr. A. Pawlowsky und stud. med. L. Buchstab.

Ausgehend von dem allgemein angenommenen wissenschaftlichen Standpunkt, dass die Ursache der Cholera der Koch'sche Komma-bacillus ist, der durch das von ihm im menschlichen Darm entwickelte und sich von hieraus überall hin verbreitende Choleragift — Peptotoxin — den ganzen Symptomencomplex des Cholera-processes beim Menschen bedingt, haben wir es unternommen, durch Versuche an Thieren die Möglichkeit ihrer Immunisirung gegen die Infektion durch das Choleragift zu erweisen.

Die positiven, auf experimentellem Wege erzielten Resultate der letzten Zeit [Bouchard²⁾, Buchner³⁾, Emmerich⁴⁾, Behring⁵⁾, Brieger und Kitasato⁶⁾, Charrin, Tizzoni⁷⁾, Klemperer⁸⁾] veranlassten uns, im Blute von Thieren jene heilkräftigen Flüssigkeiten und Körper zu suchen, welche imstande wären, Thiere, wie auch den Menschen vor Infektion durch starkes Choleragift zu bewahren resp. davon zu heilen.

Die überraschenden Resultate, die wir bei fast allen Versuchen mit Blutserum immuner Thiere erhielten, haben uns überzeugt, dass dasselbe heilkräftige Eigenschaften besitzt, welche Thiere gegen die Infektion durch Choleragift von sehr hoher Virulenz immunisiren, und dass es die Mehrzahl der erkrankten von einer Giftdosis heilt, die an sich durchaus tödtlich ist.

Unsere Arbeit zerfällt in drei Theile: 1) Immunisirung der Thiere, 2) Gewinnung des Blutserums von ihnen und Erforschung seiner

¹⁾ De l'intervention chirurgicale dans les Tumeurs du rein. Thèse, Paris 1891.

²⁾ Bouchard, Les microbes pathogènes. Paris 1892.

³⁾ Buchner, Centralbl. f. Bacteriologie 1892.

⁴⁾ Emmerich und Tsuboi, Die Natur der Schutz- und Heilsubstanz des Blutes. Wiesbaden 1892.

⁵⁾ Behring, Die Blutserumtherapie. Leipzig 1892, siehe auch Deutsche med. Wochenschrift 1890 No. 49 u. 50.

⁶⁾ Brieger, Kitasato und Wassermann, Ueber Immunität und Giftfestigung. Zeitschr. f. Hygiene 1892, Bd. XII.

⁷⁾ Tizzoni, Virchow's Festschrift Bd. III; Deutsche med. Wochenschrift 1892; Riforma medica 1892, V, III, 192.

⁸⁾ Klemperer. Berl. klin. Wochenschrift 1892 No. 50.

Eigenschaften und 3) Immunisirung und Heilung der Thiere durch das gewonnene Blutserum.

Bei unseren Versuchen, Thiere gegen das Cholera Gift immun zu machen, folgten wir methodisch den Anweisungen Pasteur's. Die ersten an Thieren vollzogenen Injectionen von Cholera culturen in das Blut und die Peritonealhöhle ergaben nur negative Resultate. Bei Einführung grosser Dosen verendete eins, eine Reihe jedoch vertrug die Einspritzungen. Die Culturen von verendeten Kaninchen und Meerschweinchen tödteten die neuen Versuchsthiere. Durch eine Reihe von Passagen durch Kaninchen und Meerschweinchen erhielten wir zwei Culturen von sehr starker und erhöhter Virulenz. Eine bestimmte Dosis (3—5 cem) tödtete die Thiere nach einem bestimmtem Zeitraum (12—20 Stunden). Um uns sicherer von der verhütenden und heilkräftigen Wirkung zu überzeugen, wurde für die Einimpfungen die grosse Dosis von 5 cem Cultur erhöhter Virulenz genommen. Die letztere Eigenschaft unserer Culturen zeigte sich in vitro, in der grösseren Reductionsfähigkeit auf Lakmustinctur, im Vergleich zu der Reductionsfähigkeit verschiedener anderer Cholera culturen aus Paris, Berlin, Annam und unserer russischen Culturen.

Die Experimente behufs Immunisirung wurden mittels Impfungen, und zwar zuerst mittels bei 56° sterilisirter Cholera culturen, sodann mit Culturen schwacher Virulenz und endlich mit den in ihrer Virulenz durch Uebertragung erhöhten Culturen (Details der Methode später) angestellt.

Die erste Reihe von Immunisirungsversuchen wurde im Herbst 1892 an 22 Kaninchen und 20 Meerschweinchen gemacht. Es erwies sich, dass man bei oben erwähnter Methode fast mit absoluter Sicherheit Kaninchen und Meerschweinchen vor Infectionen mit grossen Dosen von Gift erhöhter Virulenz immun machen kann. Bei Einführung des Giftes in das Blut kann man die Immunisirung der Kaninchen beschleunigen. In der Peritonealhöhle haben wir eine sehr grosse Höhle und schaffen demnach bei einer geringen Grösse des Thieres ungewöhnlich günstige Bedingungen für die Resorption und Verbreitung des Giftes im Körper, weshalb auch die erste Reihe der positiven Versuche auf dem Gebiete der Immunisirung und Heilung der Thiere eine besonders überzeugende Beweiskraft und Bedeutung gewinnt.

Die zweite Versuchsreihe bezieht sich auf Immunisirung der Kaninchen und Meerschweinchen durch das Unterhautzellgewebe. Führt man Kaninchen und Meerschweinchen unter die Haut etliche mal zuerst sterilisirte, sodann abgeschwächte (virulente) und schliesslich Culturen erhöhter Virulenz ein, so bleiben die Thiere geschützt vor Ansteckung durch das Gift von erhöhter Virulenz, das in die Peritonealhöhle eingeführt worden.

Die dritte Versuchsreihe betrifft die Immunisirung der Kaninchen per os. Nach Einführung der Culturen mittels Sonde in den Magen in derselben allmählichen Steigerung wie oben werden Kaninchen gegen intraperitoneale Injectionen des Giftes erhöhter Virulenz refractär.

Nachdem wir solche Resultate hoher Immunität an kleinen Thieren erhalten hatten, dachten wir auf demselben Wege zum letzten Ziel zu gelangen, d. i. Unempfänglichkeit gegen die Cholera auch dem Menschen mitzuthellen; es erschien uns jedoch rationeller, anstatt den Menschen einer langdauernden Reihe von Impfungen zu unterziehen, die, wie a priori anzunehmen, auf seinen Zustand nicht ohne Einfluss bleiben können, vielmehr heftige Reaction und sogar dauernde Veränderungen seines Organismus hervorrufen müssen, in bereits immunen Thieren die heilkräftigen Stoffe zu suchen, welche sowohl die Immunität des Menschen, wie vielleicht sogar auch seine Heilung von bereits eingetretener Krankheit bedingen könnten. Wir setzten auf Grund der neueren Arbeiten von Lazarus, Botkin und Klemperer voraus, dass auch bei Cholera im Blutserum jene heilkräftigen Stoffe enthalten sein müssen, die schon von Behring, Kitasato, Wassermann, Brieger und Klemperer bei Diphtheritis, Tetanus und Lungenentzündung gefunden, und durch deren Anwendung bei Heilversuchen bereits glänzende Resultate erzielt worden sind. Es ist dadurch eine neue Richtung in der Medicin geschaffen, welche Behring die „Blutserumtherapie“ nennt.

Auf Grund solcher Erwägungen wurde Blutserum vom Kaninchen in besonderen Cylindern aseptisch gesammelt, wobei sich herausstellte, dass dasselbe Kaninchen und Meerschweinchen fast absolut immunisirende und auch die Eigenschaften besitzt, von einer Infection mit tödtlichen Dosen von Cholera Gift erhöhter Virulenz zu heilen. Einige Versuche seien hier zur Erläuterung vorgeführt.

Zwei Kaninchen, durch vorläufige einmalige intraperitoneale Injectionen von 1 und 2 cem Serum von immunen Kaninchen behandelt, wurden immun gegen eine tödtliche Dosis von 5 cem einer Cultur erhöhter Virulenz, welche am anderen Tage in die Peritonealhöhle eingeführt wurde.

Zwei andere, die zuerst unter die Haut je 2 cem Blutserum und dann am anderen Tage je 5 cem Cholera culturen in die Peritonealhöhle und je 1 cem Serum eines immunen Kaninchens unter die Haut erhielten, vertrugen ohne sichtliche Beschwerden diese für die Controllkaninchen tödtliche Dosis.

Zwei Kaninchen, denen je 5 cem Gift von erhöhter Virulenz in das Peritoneum und zu 4½ cem Serum immuner Kaninchen unter die Haut eingeführt worden, blieben gesund.

Zwei Meerschweinchen, die je 5 cem Gift erhöhter Virulenz in die Peritonealhöhle und je 1 cem Kaninchenserum unter die Haut, ferner nach zwei Stunden noch je 1 cem und nach weiteren zwei Stunden noch je 1 cem erhielten, erlagen der tödtlichen Dosis nicht.

Bei der Blutgewinnung von Kaninchen, selbst aus der Arteria carotis communis zeigte sich, dass dieselbe mit sehr grossen technischen Schwierigkeiten verbunden ist. Die Arterie ist dünn, beim Einschnitt reisst sie; es war daher nöthig, für die Blutgewinnung ganz besondere Gefässe herzustellen. Viele Kaninchen, im Laufe von mehr als zwei Monaten immun gemacht, gingen bei der Blutentnahme ein. Bei der Mehrzahl gelang es, 20—30 cem Blut bzw. 8—10 cem Serum in aseptischem Zustande zu gewinnen. Es ist klar, dass das Material nicht ausreichend war, um es zu Heilzwecken zu verwenden. Es war daher nothwendig, zu Experimenten an grösseren Thieren überzugehen.

Im Hinblick auf die positiven Resultate, die Gamaleja bei Einspritzung virulenter Culturen bei Hunden experimentell erzielt hat, sowie im Hinblick auf die nahe Verwandtschaft des Blutserums der Hunde mit dem des Menschen wählten wir grössere Hunde als Versuchsobject. Wir wurden hierzu auch durch die Verhältnisse unseres Laboratoriums veranlasst; unter anderen, besseren Bedingungen können natürlich auch eine Reihe anderer grösserer Thiere für Immunisirungszwecke verwendet werden.

Um die Hunde immun zu machen, schlugen wir denselben Weg ein, wie oben bei den Kaninchen. Anfangs wurden abgeschwächte, danach Culturen erhöhter Virulenz in die Vena jugularis eingespritzt. Es entwickelte sich Durchfall und Erbrechen mit allgemeiner Schwäche und Appetitlosigkeit für die Dauer von ein bis zwei Tagen, worauf allmähliche Genesung eintrat. Eine zweite oder dritte Einspritzung rief schon eine wesentlich schwächere Wirkung hervor. Als tödtliche Dosis erwiesen sich 10 cem unserer Cultur erhöhter Virulenz.

Zur Illustration unseres Verfahrens führen wir den Tageszettel für einen unserer Hunde an:

8. Januar in die Vena jugularis 10 cem abgeschwächter Cultur; 12. Januar 10 cem virulenter Cultur; 22. Januar 30 cem virulenter Cultur in die Peritonealhöhle; 25. Januar 10 cem Cultur erhöhter Virulenz in die Vena cruralis; 5. Februar 20 cem von derselben Cultur in das Peritoneum. Am 9. Februar wurden 500 cem Blutserum entnommen und 10 cem virulenter Cultur in die Arteria carotis eingespritzt. Auf diese Weise erhielt der Hund 90 cem Cultur. Als hohen Grad von Immunität erachten wir den Augenblick, wo der Hund im ganzen gegen 100 cem virulenter Cultur verträgt.

Unsere Versuche haben wir an elf Hunden gemacht. Indem wir in sterilisirten Cylindern 400—500 cem Blut sammelten, erhielten wir aus demselben bis 100 cem durchsichtiges Blutserum. Es erwies sich, dass diesem sehr hohe immunisirende und für Kaninchen, Meerschweinchen und Hunde sogar heilkräftige Eigenschaften innewohnen.

Bevor wir die physiologische Wirkung dieses Blutserums an Thieren erprobten, machten wir einige Reactionen in vitro. Das Blutserum immuner Thiere, steril für die Dauer einiger Tage nach seiner Gewinnung, besass bactericide Eigenschaften; die in dasselbe eingeführte Cultur ergab kein Wachsthum, während in dem Controllserum ein grosses Wachsthum eben derselben Generation von Mikroben statt hatte. Wir hofften sodann in diesem Serum den immunisirenden Grundstoff zu finden, der im Organismus das Gift des Cholera vibrio neutralisirt. A priori voraussetzend, dass diese Reaction auch ausserhalb des Organismus — in vitro — eintritt, setzten wir der Cholera peptonbouillon Serum von einem immunen Thiere zu und liessen sie 24 Stunden im Thermostaten stehen; nach 24 Stunden gab zugesetzte Salzsäure schon nicht mehr die für die Cholera cultur charakteristische Reaction, die sogenannte Bujwid'sche Reaction; die Cultur färbte sich nicht dunkelblau-roth, was darauf hinwies, dass in unserem Probirglase schon nicht mehr die giftigen Peptotoxine vorhanden waren, die mit HCl die Indolreaction geben. So erhielten wir auf chemischem Wege in vitro den Beweis für die Zersetzung der Cholera toxine.

Und was ergibt sich für den Organismus? Die Versuche haben gezeigt, dass nicht nur die immunisirende, sondern auch die heilende Kraft des Serums von immunen Hunden sehr gross ist.

Im ganzen wurden mit demselben 45 Versuche an Thieren gemacht. Drei Kaninchen wurden in die Peritonealhöhle 10 ccm Blutserum eingeführt, wonach die Thiere 5 ccm und später 10 ccm Culturen vertrugen, von denen 5 ccm die Controllkaninchen tödteten. Ein Meerschweinchen erhielt 0,5 ccm Cultur mit 0,5 ccm immunen Serums und nach 7 Tagen 5 ccm immunen Serums halb mit Cultur; ein anderes 3 ccm und am folgenden Tage 5 ccm Serum, beide Meerschweinchen widerstanden einer tödtlichen Giftdosis von 5 ccm. Sechs Kaninchen wurden 5—7 ccm Choleraeultur erhöhter Virulenz in die Peritonealhöhle und gleichzeitig 5 ccm Serum von einem immunen Hunde unter die Haut gespritzt. Einem Meerschweinchen 5 ccm Cultur erhöhter Virulenz in die Peritonealhöhle zur Hälfte mit Blutserum von einem Hunde. Die Controllthiere, denen 5 ccm Choleraeultur in die Peritonealhöhle eingespritzt worden, gingen nach 12 Stunden ein; diejenigen dagegen, denen Serum gegeben worden, leben bis zu dieser Zeit, obwohl die Versuche schon vor mehr als einem Monat angestellt wurden.

Nach solchen Erfahrungen entschlossen wir uns, einerseits Kaninchen, nachdem sie zuvor durch 5 ccm Blutserum immun gemacht worden, 10 ccm einer Cultur einzuführen, von welcher schon 3 ccm ein nicht immun gemachtes Kaninchen tödteten, und andererseits eine immunisierende Dosis Blutserum von 2 oder 1 ccm auf das Kaninchen zu geben. Die Immunität auch in letzterem Falle war ausserordentlich gross: die Kaninchen vertrugen grosse Dosen virulenter Culturen. Nehmen wir z. B. aus unseren Tageslisten den an einem Kaninchen gemachten Versuch No. 10: es empfing 1 ccm Blutserum unter die Haut, am anderen Tage 5 ccm virulenter Choleraeultur und nach 7 Tagen 10 ccm Choleraeultur; es lebt noch jetzt. Solcher Experimente wurden fünf gemacht. Beachten wir, dass bei allen Versuchen die Controllthiere bei 3 bis 5 ccm schon nach 12 Stunden zugrunde gingen. Schliesslich erlangten wir die Immunität gegen tödtliche Choleraeulturen, indem wir eine Minimaldosis von 0,1 ccm und sogar von 0,02 ccm Blutserum von immunen Hunden einspritzten (vier Versuche).

Nachdem wir den hohen Immunitätsgrad bei unseren Hunden und die bedeutende immunisierende Kraft ihres Blutserums constatirt hatten, musste der Immunitätsgrad nach Brieger's und Erlich's Methode bestimmt und die Heilkraft des Serums erprobt werden. Die Immunität unserer Hunde erwies sich als gleich minimum 130 000, d. h. ein Gramm ihres Serums kann ein Thier von 130 000 g Gewicht, oder 0,5 ccm solchen Serums 60 kg Gewicht (Gewicht eines Menschen) vor einer tödtlichen Dosis schützen.

Weitere Versuche wurden folgendermaassen angestellt. In die Peritonealhöhle der Kaninchen (zwei Versuche) wurde eine Mischung von 5 ccm virulenter Choleraeultur und 1 ccm Serum eingeführt. Die Controllthiere gingen zugrunde, die Versuchsthiere aber blieben leben, woraus sich ergibt, dass das Choleragift schon in vitro durch das Serum neutralisirt wurde. Immunitätsversuche an Thieren mit Hundeserum wurden 17 gemacht. Die dabei erhaltenen positiven Resultate waren so überzeugend, überraschten so durch die deutlich wahrnehmbare Stetigkeit der Genesung der Thiere von tödtlichen Dosen, dass die Nothwendigkeit auf der Hand lag, Heilversuche an mit Choleraeulturen infectirten Kaninchen mit Hundeserum vorzunehmen. Das Heilverfahren war folgendes: dem Kaninchen wurden 5 ccm virulenter Choleraeultur in die Peritonealhöhle eingespritzt, dann wurde nach ein, zwei und fünf Stunden (bei verschiedenen Versuchen verschieden) unter die Haut Blutserum von immunen Hunden eingeführt. Alle Controllthiere gingen ein, 75% der Versuchsthiere blieben leben (16 wurden behandelt, davon gingen vier ein). Zu diesem Zweck wurden anfänglich grosse Mengen Blutserum genommen und dieselben sodann stetig verringert; die Dosis unserer Arznei allmählich von 5 ccm herabsetzend, gelangten wir zu einer Dosis von 2 ccm, die drei Stunden nach der Infection einzuspritzen war. Dem Kaninchen No. 11 wurden z. B. um 12 Uhr mittags 5 ccm Choleraeultur in die Peritonealhöhle eingespritzt, nach drei Stunden 2 ccm Serum, nach sieben Tagen 10 ccm Cultur erhöhter Virulenz. Die Wirkung war eine volle: das Thier wurde gesund. 5 ccm Blutserum zeigten ihre durchaus heilkräftige Natur bei ihrer Einführung in die Peritonealhöhle zwei und sogar fünf Stunden nach der Infection. Die heilkräftigen Eigenschaften des Hundeserums waren so augenfällig, dass, als zufällig bei der Immunisirung zweier Hunde diesen eine dem Grade ihrer Vorbereitung nach allzu grosse Dosis virulenter Cultur (30 ccm) eingespritzt und hierdurch bei ihnen das Schauspiel einer stürmischen Choleraerkrankung hervorgerufen wurde, wir den einen von ihnen mit seinem immunen Kammeraden entnommenen Serum behandelten, während der andere zur Controlle ohne Behandlung belassen wurde. Dieser zweite ging ein, während der erste fünf Stunden nach der Injection des Serums wieder vollständig gesund war.

Solcher Art sind in Kürze die Resultate unserer experimentellen Versuche. Sie lassen uns hoffen, dass solche Versuche nicht auf das Laboratorium beschränkt bleiben, dass man nach den erhaltenen Resultaten vielleicht nun auch zu Versuchen am Menschen übergehen kann. Zur Klarlegung unserer theoretischen Anschauung von der Immunitätsfrage ist nothwendig hinzuzufügen, dass neben den biologischen Erscheinungen eines Kampfes des Organismus mit den Mikroben die oben dargelegten Versuche uns das Recht geben, in der Bildung des heilkräftigen Grundstoffes im Blute immuner Thiere — des Antitoxin — eine chemische Reaction zu sehen. Kommt das circulirende Eiweiss in Contact mit solchem labilen Körper von grossem Moleculargewicht und höherer chemischer Affinität wie das Peptotoxin des Cholera vibrio, so ist es sehr wahrscheinlich, dass hier eine solche Reaction zu Stande kommt. Wir wollen hier beifügen, dass im Laboratorium des Herrn Prof. Pawlowsky Herr Dr. Schalin¹⁾, der sich mit Phagocytose bei Choleraeinfektion beschäftigt hat, zeigte, dass die Phagocytose bei einigen nicht immunen Thieren fast nicht existirt und bei anderen viel geringer ist, als bei den immunen. Beim Untergang von immunen Thieren, die des Versuchs wegen eine zu grosse Dosis erhielten, bemerkte er nämlich immer eine makroskopisch schon bemerkbare starke Phagocytose, in einer Peritonitis purulenta, die niemals bei nicht immunen Thieren constatirt wurde. Wir sind geneigt, in dieser Thatsache einen Beweis zu sehen, dass das im Blut von gegen Cholera immunen Thieren circulirende Antitoxin positiv chemotactisch sei. Das wurde auch von Herrn Dr. Schalin bestimmt, indem er Capillaren mit dem Antitoxin füllte und sie in das Ohr eines Kaninchens hineinsteckte. In zwei Stunden waren die Capillaren voll weisser Blutkörperchen. —

Wir versuchten weiterhin, aus dem Serum den immunisierenden und heilenden chemischen Grundstoff auszuschleiden. Manipulirend mit einfachen chemischen Reactionen, um eine Zersetzung dieses wenig stabilen Körpers zu vermeiden, erhielten wir einen Stoff, mit dem wir physiologische Versuche anstellten, welche zeigten, dass seine immunisierende Kraft ebenso gross ist, wie seine Auflösung im Serum. Ferner fanden wir ein Mittel, das Blutserum zu conserviren, ein Mittel, mit dessen Gewinnung wir uns viele Mühe gaben, im Hinblick darauf, dass das Serum sich unter dem Einfluss destillirten Wassers zersetzt, und wir jegliche Art von Solution vermeiden mussten.

Schliesslich fügen wir hinzu, dass wir, um die Unschädlichkeit des immunisierenden Elementes zu erproben, uns selbst unter die Haut 1 ccm Blutserum von einem immunen Hunde und dem Laboratoriumsdiener 1 ccm Blutserum von einem immunen Kaninchen eingespritzt haben. Es zeigte sich gar keine Reaction, der Puls blieb unverändert, die Temperatur erhöhte sich nicht, wie auch keine Veränderungen der Sensibilität sich beobachten liessen.