[Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern.]
(Direktor: Prof. Dr. Tavel.)

Experimentelles über Immunisierung mit Choleranukleoproteid.

Von

Eduard Biell.

Einleitung.

Die Kenntnis der chemischen Konstitution der den Bakterienkörper bildenden Substanzen ist um so wichtiger, als eben diese Substanzen manchmal wirksame Impfstoffe bilden. Eine Reihe dieser mit toxischen und immunisierenden Eigenschaften ausgestatteten Körper ist unter dem etwas zu allgemeinen Namen der Proteine zusammengefaßt worden.

Die Choleratoxine aus dem Körper der Choleravibrien zu isolieren und sie von verschiedenen Gesichtspunkten der bakteriologischen Forschung zu studieren, hat eine Reihe von Autoren beschäftigt.

Die chemische Struktur der Bakterien überhaupt wurde von vielen, unabhängig von der Frage der Immunität, studiert, und es wurde gefunden, daß in dem Bakterienkörper die Proteinsubstanzen vorwiegen. So sagt Cramer, daß im Bakterienkörper Proteinsubstanzen gegenüber den Kohlehydraten in weitaus vorwiegender Menge vorhanden sind. Proteinsubstanzen in Bakterien wurden ferner nachgewiesen von Nencki beim Milzbrandbazillus (Anthraxprotein), von Brieger beim Pneumococcus, von Hammerschlag und von Weyl bei den Tuberkelbazillen. Später haben sich noch viele namhafte Forscher mit der Chemie der Bakterien befaßt.

Als Gino Galeotti sich im Jahre 1896 mit dem Studium der aus Cholerakulturen gewinnbaren immunisierenden Substanzen beschäftigte, konnte er konstatieren, daß das Impfvermögen Substanzen zukommt

welche, obgleich alle der Gruppe der Proteine angehörig, verschiedene chemische Konstitution besaßen. Er sah ferner, daß am kräftigsten immunisierend ein phosphorhaltiger Körper wirkte, welchen er infolge seiner chemischen Eigenschaften in die Klasse der Nukleoproteide reihte.

Die Gewinnung dieses Choleranukleoproteides geschah nach der Methode von Hammersten und Lustig durch Auflösen der Cholera-vibrionen in 1prozentiger Kalilauge und darauf folgende Fällung in Essigsäure.

Nach Arbeiten von Baag Ivar „Über Nukleoproteide und Nukleinsäuren“ hat dieser Körper ganz charakteristische Merkmale. Alle Nukleoproteide haben 3 verschiedene Komponenten:

1. Eiweiß (es können auch mehrere Eiweißkomponenten vorkommen).
2. Phosphorsäure.
3. Xanthinbasen.

Ferner hat sich gefunden, daß die Phosphorsäure und die Xanthinbasen in den Nukleoproteiden als eine Verbindung, eine organische Phosphorsäure vorkommen. Diese organische Phosphorsäure wird Nukleinsäure benannt. Man kann deshalb die Nukleoproteide als Verbindungen zwischen Eiweiß und Nukleinsäuren definieren. Von diesen beiden Verbindungen ist die Nukleinsäure sowohl in chemischer, wie physiologischer Beziehung die wichtigste.

Bendix konnte nachweisen, daß ein charakteristischer Bestandteil des Nukleoproteides die Pentosen sind. Er stellte sich auch nach Vorschrift Hammerstens ein Nukleoproteid dar. Die Substanz war unlöslich in Wasser, Säuren, Alkohol, Äther, leicht löslich in Alkalien und war stark phosphorhaltig. Die kleinsten Körnchen dieses Nukleoproteides gaben schon eine außerordentlich starke Pentose- und Phosphorsäurereaktion.

Die immunisierende Wirkung der Bakteriennukleoproteide war also zuerst von Galeotti festgestellt worden und veranlaßte bald verschiedene Forscher sich eingehend mit diesen spezifischen Vorgängen zu beschäftigen. Besonders Lustig und Galeotti haben zahlreiche Untersuchungen über den präventiven Wert dieses so aus Pestbazillen gewonnenen Vaccins an Mäusen, Ratten und anderen Tieren vorgenommen und auch nachgewiesen, daß das aus den immunisierten Pferden erhaltene Serum kuratives Vermögen besaß. Ihre experimentellen Untersuchungen bei Affen über Schutzimpfung und Serumtherapie gegen Beulenpest geben darüber Aufschluß.

Tiberti, Tavel, Krumbein und Glücksmann konnten ebenfalls die immunisierende Wirkung der von ihnen extrahierten Nukleoproteide feststellen.

Genauere Untersuchungen über immunisierende Eigenschaften des aus den Choleravibrionen gewonnenen Choleranukleoproteides hat im vorigen Jahr Schmitz im hiesigen Institut zur Erforschung von Infektionskrankheiten angestellt, die überaus günstige Resultate erzielten und den Direktor des hiesigen Institutes, Herrn Professor Tavel, dazu veranlaßten, mich mit der genauen Nachprüfung und weiteren Ausarbeitung der Versuche zu betrauen. Ich verfehle daher nicht, ihm an dieser Stelle für Überlassung der Arbeit und die lebenswürdige Unterstützung meinen besten Dank zu sagen.

Schmitz hatte festgestellt, daß das nach der Lustigschen Methode bereitete Choleranukleoproteid imstande ist, im tierischen Organismus einen sicheren Schutz gegen eine künstliche Cholerainfektion hervorzurufen. Mir liegt es nun ob, zu beweisen, daß im Blutserum der so immunisierten Tiere spezifische Cholera-Immunkörper auftreten, und daß dem Immunsérum präventive und bis zu einer gewissen Grenze auch kurative Eigenschaften zukommen.

1. Einfluß 1 prozentiger Kalilauge auf Choleravibrionen.

Bekanntlich werden bei der Bereitung des Cholera-Nukleoproteids nach der Lustigschen Methode, die auf breiten Agarflächen gewachsenen üppigen Beläge mit Kalilauge behandelt, wodurch dieselben zur Auflösung gebracht werden sollen. Ich stellte nun Versuche an, wann die Abtötung und in welchem Zeitraum völlige Auflösung der Choleravibrionen stattgefunden hat.

Ich übergab Agarkulturen mit 1 prozentiger Kalilauge und überzeugte mich nach 5, 10, 30 Minuten und einer Stunde von der fortschreitenden Einwirkung durch jeweilige Anlage von Bouillonkulturen und mikroskopische Betrachtung, sowohl im hängenden Tropfen als auch im gefärbten Präparat.

Nach 5 Minuten sind die Vibrionen, im hängenden Tropfen betrachtet, stark aufgequollen; Bewegung fehlt ihnen. Im gefärbten Präparat sind nur wenige Vibrionen sichtbar. Die Bouillonkultur bleibt steril.

Nach 10 Minuten zeigt sich ein ungefähr gleiches Verhalten, nur daß die Zahl der im gefärbten Präparat noch sichtbaren Vibrionen geringer geworden ist. Auch hier bleibt die angelegte Bouillonkultur steril.

Nach 30 Minuten sind intakte Vibrionen nicht mehr sichtbar und

Nach 1 Stunde hat sich völlige Auflösung vollzogen. Im gefärbten Präparat sind nur noch kleine Bakterientrümmér sichtbar. Die angelegte Bouillonkultur bleibt ebenfalls steril.

Hieraus ergibt sich, daß die Abtötung sehr schnell stattfindet, und daß sich schon nach 1 Stunde völlige Auflösung vollzieht. Man kann daher mit Sicherheit annehmen, daß ganze Bakterienleiber bei der Darstellung im großen, wo man die Lauge 2 bis 3 Stunden einwirken läßt, nicht mehr vorhanden sind und so auch nicht die Spezifität des aus dem Niederschlag gewonnenen Vaccins bedingen können.

II. Darstellung des Cholera-Nukleo-Proteïdes.

Bei der Herstellung des Vaccins hielt ich mich an die Angaben Lustigs und Schmitzs und versuchte durch einige kleine Abänderungen ein möglichst keimfreies Produkt herzustellen.

Zu diesem Zweck filtrierte ich einen Teil (ca. 300 ^{ccm}) der durch Abspülen der Bakterien mit 1 prozentiger Kalilauge erhaltenen trüben Lösung durch eine sterile Berkefeldtkerze unter Druck. Die Filtration ging aber nur sehr langsam von statten, bei einem Versuch sogar erst in einem Zeitraum von 3 Tagen. Bei der Fällung entstand in der filtrierten Lösung nur ein geringer Niederschlag, der getrocknet 0.07 ^{g^{rm}} Cholera-Nukleo-Proteïd als Rückstand ergab, während bei direkter Fällung in 300 ^{ccm} einer analogen Vibrionen-Kalilaugelösung 0.4 ^{g^{rm}} Vaccin resultierten. Beim Herausnehmen der Kerzen zeigte sich dann auch ein dicker schleimiger Belag auf denselben, welcher das langsame Filtrieren veranlaßt hatte. Es ist dieses leicht erklärlich, da die eiweißartige Leibessubstanz der Vibrionen, wie die meisten Eiweißarten, durch Behandlung mit Kalilauge nur eine kolloidale Lösung eingeht und sich nicht auf diese Art filtrieren läßt.

Ich stellte mir auf diese Art ca. 0.15 ^{g^{rm}} Vaccin her und immunisierte damit zwei Meerschweinchen. Jedes konnte nach einer 8 Tage später mit der dreifachen tödlichen Dosis vorgenommenen Infektion diese überstehen, wodurch als erwiesen anzusehen ist, daß die Immunität durch bestimmte in den Bakterien durch die Kalilauge gelöste und durch Essigsäure niedergeschlagene spezifische Eiweißsubstanzen hervorgerufen wird, und daß nicht etwa noch vorhandene Cholerabakterienleiber die Wirkung des Vaccins bedingen.

Abweichend von den Angaben Schmitzs zentrifugierte ich den durch Fällung mit Essigsäure aus der Natronlaugelösung erhaltenen Niederschlag, nachdem ich ihn durch mehrmaliges Dekantieren von der Säure befreit hatte, in sterilen, verschlossenen Röhren, brachte dann den dicken weißen Brei, der sich abgesetzt hatte, auf sterile Glasschalen und trocknete ihn im Vakuum. Ich erhielt so einen hellbraunen Rückstand, der sich leicht in

Form von glänzenden Schüppchen ablösen ließ, und den ich bis zum Gebrauch in kleinen sterilen braunen Gläsern mit Gummistopfen verschlossen aufbewahrte.

Der von mir auf diese Weise gewonnene Körper zeigte die für Nukleoproteide charakteristischen chemischen Eigenschaften. Er war unlöslich in Wasser, Säuren, Alkohol, Äther, leicht löslich in Alkalien. Die kleinsten Körnchen dieser Substanz gaben schon eine sehr starke Pentose- und Phosphorsäurereaktion.

Zum Gebrauch stellte ich mir jedesmal eine 1 prozentige Choleranukleoproteidlösung in verdünnter Sodalösung (1 Prozent) her. Versuche, die Vaccinlösung mit Chloroform noch von den darin befindlichen indifferenten Luftbakterien zu befreien, gelangen nicht; dagegen wandte ich bei einigen Tieren einen Zusatz von 0.5 Prozent Karbolsäure zur Vaccinlösung an und konnte so gute Resultate erzielen. In der Praxis würde sich dieser Zusatz sicher empfehlen.

Einen Teil des Choleranukleoproteids verrieb ich mit gleichen Teilen Kampfer und bewahrte dieses Gemisch mehrere Monate auf. Die indifferenten Luftbakterien konnten aber auch auf diese Weise nicht ganz vernichtet werden. Ein Immunisierungsversuch mit hiervon bereiteter Lösung fiel sehr günstig aus, wie aus dem Protokoll des Tieres XVIII ersichtlich ist.

Die Giftigkeit des von mir hergestellten Vaccins war die gleiche, wie Schmitz sie angegeben hat. 0.03 grm Choleranukleoproteid töteten bei intraperitonealer Applikation ein Meerschweinchen von 300 grm innerhalb 24 Stunden.

Hier möchte ich die Protokolle der Immuntiere einfügen, die am besten die Art und Weise meiner Immunisierungsversuche erläutern werden. Es wurden im allgemeinen Dosen von 0.05 grm verabfolgt, die aber bei einzelnen Tieren, als ich sah, daß solche Dosen gut vertragen wurden, auf 0.1 grm erhöht wurden. Temperatursteigerungen konnten bei den verabfolgten Dosen in nur geringem Maße beobachtet werden, und war das Befinden der Tiere nach kurzer Zeit wieder normal. Dagegen war bei 2 Tieren eintretender Abortus als Folge der Vaccination anzunehmen. Bei den Tieren I und II wurde noch Choleranukleoproteid angewandt, welches von Schmitz zu seinen Arbeiten angefertigt war. Hier bekam Tier I im Verlauf der zahlreichen subkutanen Injektionen eine starke Infiltration, während Tier II mit einem großen Abszeß reagierte. Beide Tiere wurden wieder geheilt. Bei der Impfung mit dem von mir hergestellten Vaccin habe ich Abszesse oder sonstige üble Nebenerscheinungen nie auftreten sehen.

I. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des ge- impften Cholera- nukleoproteïdes	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
5. V. 05.	2.370	0.001 ^{grm} Vaccin	38.6	Tier gesund, ohne Räude.
6. „	2.430	—	39.0	Befinden des Tieres gut.
8. „	2.370	—	38.45	Befinden völlig normal.
10. „	2.400	0.001 ^{grm} Vaccin	39.00	„ „ „
11. „	2.370	—	39.60	Befinden, abgesehen v. d. Temp., gut.
16. „	2.520	0.015 ^{grm} Vaccin	38.70	Befinden gut.
17. „	2.500	—	39.00	„ „
19. „	2.460	0.020 ^{grm} Vaccin	38.50	„ „
20. „	2.400	—	39.10	„ „
22. „	2.400	0.030 ^{grm} Vaccin	38.10	„ „
25. „	2.320	0.050 „ „	38.50	„ „
26. „	2.270	—	39.20	Befinden im allgemeinen gut, hinten an der rechten Seite eine ziemlich starke Infiltration.
31. „	2.275	0.050 ^{grm} Vaccin	38.70	—
2. VI. 05.	2.050	—	39.00	Am 1. VI. 05. Abortus. Fieber, Tier nicht normal.
3. „	2.050	—	39.60	—
4. „	2.080	—	38.50	Tier wieder normal.
7. „	2.100	0.050 ^{grm} Vaccin	38.90	Befinden gut.
13. „	2.120	0.050 „ „	39.00	„ „
19. „	2.180	0.050 „ „	39.00	„ „
23. „	2.100	0.050 „ „	38.50	„ „
28. „	2.150	—	39.00	Blutentnahme am Ohr. Agglutinationstiter 1:700. Bakterizider Titer 0.002.
12. VII. 05.	2.410	0.050 ^{grm} Vaccin	39.70	—
19. „	2.420	0.050 „ „	39.50	Tier normal.
24. „	2.450	0.050 „ „	39.20	„ „
27. „	2.430	—	38.90	Totale Entblutung.

Am 27. VII. totale Blutentnahme an der Carotis zur Serumgewinnung.
 Gesamtmenge des verabfolgten Choleranukleoproteïdes . . . 0.526 ^{grm}.
 Agglutinationstiter des Serums 1:5000.
 Bakterizider Titer „ „ 0.001.

II. Kaninchen, Bock.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Choleranukleo- proteïds	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
5. V. 05.	2.650	0.001 ^{grm} Vaccin	38.6	Tier gesund.
6. „	2.690	—	40.1	„ „
8. „	2.570	—	38.0	„ „
10. „	2.520	0.010 ^{grm} Vaccin	39.4	„ „
16. „	2.600	0.015 „ „	39.1	„ „

II. Kaninchen, Bock. (Fortsetzung.)

Datum	Gewicht in kg	Menge des Choleranukleo- proteids	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
19. V. 05.	2.400	0.020 ^{grm} Vaccin	39.4	Tier gesund.
22. „	2.500	0.030 „ „	39.1	Infiltration am Rücken.
25. „	2.450	0.050 „ „	38.9	„ „ „
29. „	2.550	—	39.6	Blutentnahme am Ohr. Agglu- tinationstiter 1:1000.
2. VI. 05.	2.480	—	39.7	An der linken Seite großer offener Abszeß, des öfteren gereinigt und mit Vioform bestreut. Am 26. VI. Tier wieder gesund.
3. „	2.460	—	40.1	—
5.-23. VI.	ca. 2.200	—	zwischen 39.1 u. 39.5	—
3. VII. 05.	2.400	—	39.1	Totale Blutentnahme an der Carotis.
		Gesamtmenge des injizierten Cholera-Vaccins.		0.126 ^{grm} .
		Agglutinationstiter		1:300.
		Bakterizider Titer.		0.05.

III. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Choleranukleo- proteids	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
5. V. 05.	2.640	0.001 ^{grm} Vaccin	38.9	—
6. „	2.710	—	39.1	Tier völlig normal.
8. „	2.585	—	38.1	„ „ „
10. „	2.620	0.015 ^{grm} Vaccin	38.1	„ „ „
11. „	2.580	—	38.15	„ „ „
12. „	2.610	0.010 ^{grm} Vaccin	38.2	„ „ „
16. „	2.710	0.020 „ „	38.6	Tier normal.
17. „	2.740	0.030 „ „	39.1	„ „ „
19. „	2.530	0.050 „ „	39.1	Hat am Nachm. Abortus, 4 tote Junge.
20. „	2.550	—	40.3	Tier ist anscheinend krank.
22. „	2.350	—	39.6	„ „ „ „
25. „	2.250	—	40.1	Tier ist auffällig abgemagert.
26. „	2.160	—	40.8	Tier stirbt an den Folgen des Abortus. Sektion: Peritonitis.

IV. Graues Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Choleranukleo- proteids	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
5. V. 05.	2.350	0.01 ^{grm} Vaccin	38.9	Tier ist gesund.
6. „	2.330	—	39.8	„ „ „
8. „	2.280	—	39.5	„ „ „
10. „	2.110	—	39.4	Stark gebissen worden, Wunde mit Lysol ausgewaschen.
12. „	2.000	—	40.2	Der Biß ist in Eiterung übergegangen.
14. „	—	—	—	An den Folgen des Bisses gestorben.

V. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Choleranukleo- proteids	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
10. V. 05.	2.120	0.01 ^{grm} Vaccin	38.7	Tier ist gesund.
11. "	2.170	—	39.5	" " "
12. "	2.130	—	40.1	Stark am Rücken gebissen, Wunde gereinigt.
15. "	—	—	—	An den Folgen des Bisses gestorben.

VI. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Vaccin in grm	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
10. V. 05.	2.550	0.010	38.6	Tier gesund.
12. "	2.520	—	39.3	" "
16. "	2.560	0.015	38.5	" "
19. "	2.520	0.025	39.0	" "
22. "	2.450	0.030	39.1	" "
25. "	2.480	0.050	38.0	" "
26. "	2.490	—	39.0	" "
31. "	2.450	0.050	38.6	" "
2. VI. 05.	2.370	—	38.9	" "
23. "	2.350	0.050	39.1	" "
24. "	2.370	—	38.6	" "
17. VII. 05.	2.450	—	38.5	Totale Blutentnahme.

Tier erhält im ganzen 0.23 ^{grm} Choleranukleoprotein.

Agglutinationstiter: 1:1000 gut sichtbar makroskopisch, 1:2000 mit d. Lupe gesehen.

Bakterizider Titer: 0.003.

VII. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Vaccin in grm	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
10. V. 05.	1.760	0.010	38.4	Tier gesund.
11. "	1.760	—	39.1	" "
12. "	1.770	—	38.5	" "
16. "	1.880	0.015	39.0	" "
17. "	1.860	—	38.8	Blutentnahme an der Ohrvene. Agglutinationstiter: 1:70.
19. "	1.800	0.025	39.0	Tier gesund.
20. "	1.730	—	39.7	" "
22. "	1.720	0.030	38.6	" "
25. "	1.670	0.050	37.8	" "
26. "	1.600	—	38.3	" "
2. VI. 05.	1.790	—	38.5	" "
3. "	1.720	—	39.7	" "
5. "	1.750	—	38.4	" "

VII. Kaninchen. (Fortsetzung.)

Datum	Gewicht in kg	Menge des Vaccin in grm	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
7. VI. 05.	1.800	0.050	38.5	Tier gesund.
8. „	1.750	—	38.6	„ „
13. „	1.760	0.050	38.6	„ „
19. „	1.780	0.050	38.6	„ „
23. „	1.610	0.050	39.8	„ „
27. „	1.700	—	38.8	Blutentnahme an der Ohrvene. Agglutinationstiter 1:1000. Bakterizider Titer 0.002.
13. VII. 05.	1.680	0.050	39.6	Tier normal.
19. „	1.780	0.050	39.2	„ „
24. „	1.770	0.050	39.0	„ „
27. „	1.760	0.050	39.5	„ „
28. „	1.780	—	39.2	Totale Blutentnahme.

Gesamtmenge des injizierten Vaccin 0.56^{grm}. Agglutinationstiter: 1:2000.

Bakterizider Titer: 0.0008.

VIII. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Vaccin in grm	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
5. VI. 05.	1.550	0.01	39.0	Tier gesund.
7. „	1.520	—	38.6	Tier hat Husten.
13. „	1.530	0.02	39.2	„ „ „
19. „	1.470	—	39.0	„ „ „
20. „	1.400	0.05	39.0	„ „ „
23. „	—	—	—	Tod an Pneumonie.

IX. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Vaccin in grm	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
5. VI. 05.	1.720	0.010	39.2	Tier gesund.
7. „	1.730	—	38.8	„ „
13. „	1.770	0.030	38.9	„ „
19. „	1.680	0.030	38.6	„ „
23. „	1.600	0.050	39.2	„ „
3. VII. 05.	1.650	0.050	39.0	„ „
13. „	1.770	0.050	39.5	„ „
19. „	1.820	0.050	39.5	Am 20. VII. teilweise Blutentnahme. Agglutinationstiter 1:2000.
24. „	1.990	0.050	39.0	—
27. „	1.870	0.050	39.2	Tier wieder normal.
29. „	1.900	—	39.0	Totale Entblutung.

Gesamtmenge des injizierten Vaccin 0.37^{grm}. Agglutinationstiter: 1:2000.

Bakterizider Titer: 0.003.

X. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Vaccin in grm	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
5. VI. 05.	1.740	0.01	38.8	Tier gesund.
7. "	1.760	—	38.9	" "
13. "	1.840	0.03	38.8	" "
19. "	1.790	0.04	38.4	" "
23. "	1.720	0.05	38.9	" "
3. VII. 05.	1.720	0.05	39.0	" "
13. "	1.780	0.05	39.0	" "
19. "	2.010	0.05	38.6	" "
24. "	2.000	—	38.7	Totale Blutentnahme.

Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.28 ^{grm}. Agglutinationstiter: 1:800.
Bakterizider Titer: 0.008.

XI. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Vaccin in grm	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
13. VI. 05.	1.810	0.025	38.8	Tier gesund.
19. "	1.830	0.030	38.9	" "
23. "	1.750	0.050	39.2	" "
3. VII. 05.	1.750	0.050	39.0	" "
13. "	1.780	0.050	39.5	" "
19. "	1.780	0.050	39.2	" "
22. "	—	—	—	Totale Blutentnahme.

Gesamtmenge des verabfolgten Vaccin 0.255 ^{grm}. Agglutinationstiter: 1:400.
Bakterizider Titer: 0.009.

XII. Kaninchen.

Datum	Gewicht in kg	Menge des Vaccin in grm	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
19. VI. 05.	1.400	0.05	38.6	Tier normal.
25. "	1.370	0.05	38.7	" "
28. "	—	—	—	Tod an Pneumonie.

XIII. Kaninchen bekommt keine Injektion.

19. VI. 05. Blutentnahme zur Gewinnung von Normalserum. Agglutinationstiter: Im Verhältnis 1:10 noch positiv. Bakterizider Titer: 0.3.

XIV. Kaninchen bekommt keine Injektion.

6. XI. 05. Totale Entblutung zur Gewinnung von Normalserum. Agglutinationstiter: Im Verhältnis 1:5 positiv. Bakterizider Titer: 0.25.

XV. Kaninchen. Teilweise Blutentnahme an der Carotis; stirbt nach 2 Tagen an Sepsis.

XVI. Kaninchen.

Datum	Ge- wicht in kg	Menge des Vaccin	Tempe- ratur Grad Cels.	Bemerkungen
20. X. 05.	2.600	0.1 ^{grm} mit 0.5 Proz. Phenolzusatz	39.0	Tier normal.
21. XI. 05.	2.250	0.1 „ „ 0.5 „ „	39.1	Am 2. XI. 05. Teilweise Blutentnahme an der Carotis (Kollodiumver- band mit Vioform). Agglutin.-Titer 1:200. Bakterizid. Titer 0.005.
22. „	2.290	—	40.0	Tier normal.
23. „	2.380	—	39.1	„ „
25. „	2.260	—	38.9	„ „
27. „	2.270	0.1 ^{grm} mit 0.5 Proz. Phenolzusatz	39.0	„ „
28. „	2.360	—	39.4	„ „
5. XII. 05.	2.200	0.2 ^{grm} mit 0.5 Proz. Phenolzusatz	39.1	„ „
7. „	2.240	0.2 „ „ 0.5 „ „	38.5	„ „

XVII. Kaninchen.

26. X. 05.	2.450	0.05 ^{grm} Vaccin	38.6	Tier bleibt normal.
3. XI. 05.	—	—	—	Teilweise Blutent- nahme an der Carotis. Agglutin.-Titer 1:100. Bakterizider Titer 0.01.
5. „	—	—	—	† an Sepsis.

XVIII. Kaninchen.

2. XI. 05.	1.850	0.1 ^{grm} Vaccin (1 + 1 Kampfer)	38.9	—
10. „	—	—	—	Blutentnahme an der Carotis. Agglutin.-Titer 1:200. Bakterizider Titer 0.05.

XIX. Kaninchen.

23. XI. 05.	2.050	0.02 ^{grm} intravenös	39.4	Tier normal.
24. „	2.020	—	39.9	„ „
25. „	2.090	—	38.5	„ „
27. „	2.060	0.02 ^{grm} intravenös	38.7	„ „
28. „	2.000	—	40.4	Starkes Fieber.
5. XII. 05.	2.000	0.04 ^{grm} intravenös	38.2	Tier wieder normal.
6. „	1.950	—	39.5	Tier hat Husten.
7. „	1.850	0.04 ^{grm} intravenös	38.6	„ „ „
8. „	1.800	—	39.6	„ „ „
9. „	1.780	—	40.3	„ „ „
10. „	—	—	—	† an Pneumonie.

Nachweis spezifischer Choleraimmunkörper im Serum der mit Choleranukleoproteid behandelten Tiere.

A. Nachweis von Agglutininen.

Zur Gewinnung von Immunserum wurden, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, Kaninchen mit steigenden Dosen Choleranukleoproteid behandelt, und nach ein, zwei oder mehreren Injektionen wurde Blut teils an der Ohrvene, teils von der Carotis entnommen.

Gruber, Durham und Bordet haben zuerst festgestellt, daß im Blutserum choleraimmunisierter Tiere neben Bakteriolyseinen noch andere spezifische Stoffe auftreten, nämlich die Choleraagglutinine. Kolle konnte dies durch spätere Versuche bestätigen und dadurch eine schnelle Methode für die Choleradiagnostik schaffen. Heute sind diese Körper eingehend studiert.

Wie Schmitz schon erwiesen hat, treten diese Agglutinine auch im Serum der mit Choleranukleoproteid behandelten Tiere auf. Ich kann dieses auf Grund meiner zahlreichen Versuche nur bestätigen.

Ich stellte mir zu meinen Proben eine Emulsion von Choleravibrionen mit 0.8 prozentiger Kochsalzlösung her, die ich filtrierte, wenn etwaige zusammengeballte Bakterienleiber eine Täuschung hätten veranlassen können. Vom Serum wurden gleichfalls in Kochsalzlösung Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 angefertigt, und mit Pipetten die in nachstehenden Tabellen angeführten Mischungen hergestellt.

Emulsion + Serum = Mischung zur Agglutination

1.6 ccm	+	0.4 ccm	.	.	.	=	1:5
1.8 "	+	0.2 "	.	.	.	=	1:10
1.9 "	+	0.1 "	.	.	.	=	1:20
1.4 "	+	0.7 "			$\frac{1}{10}$	=	1:30
1.6 "	+	0.4 "			"	=	1:50
1.8 "	+	0.3 "			"	=	1:70
1.8 "	+	0.2 "			"	=	1:100
1.9 "	+	0.1 "			"	=	1:200
1.4 "	+	0.7 "			$\frac{1}{100}$	=	1:300
1.5 "	+	0.5 "			"	=	1:400
1.6 "	+	0.4 "			"	=	1:500
1.8 "	+	0.3 "			"	=	1:700
1.8 "	+	0.2 "			"	=	1:1000
1.9 "	+	0.1 "			"	=	1:2000
1.4 "	+	0.7 "			$\frac{1}{1000}$	=	1:3000
1.5 "	+	0.5 "			$\frac{1}{10000}$	=	1:4000
1.6 "	+	0.4 "			"	=	1:5000.

Als Kontrolle wurden bei jedem Versuche 2^{cem} der Emulsion ohne Serumzusatz in den Brutraum gestellt und dort bei 37° C. belassen. Nach 30 Minuten, 1 und 2 Stunden wurde die agglutinierende Wirkung des Serums makroskopisch festgestellt.

Nach Angaben von Kolle, der die Agglutinationskraft von Normalsera der verschiedensten Tierspezies untersuchte, soll normales Kaninchen-serum in größerer Verdünnung wie 1:20 nicht mehr Choleravibrionen agglutinieren. Ich probierte fünf Normalkaninchensera auf ihre Agglutinationskraft, wobei ich ein Serum (von Tier XVI, siehe Tabelle) fand, das noch in einer Verdünnung von 1:30 deutliche Agglutination verursachte. Drei Proben ergaben selbst in Verdünnungen von 1:5 negatives Resultat, während ein anderes Serum noch in einer Verdünnung von 1:10 agglutinierte.

Agglutinationstiter normaler Sera nach Kollé:

Kaninchen . . .	mehr als	1 : 20
Esel	„ „	1 : 25
Pferd	„ „	1 : 40
Ziege	„ „	1 : 50.

Tabelle der eigenen Versuche.

[illegible]

Durch Impfung mit Choleranukleoproteid stiegen diese Werte schon nach einmaliger Dosis ganz bedeutend. Hierüber geben drei Versuche Aufschluß. Bei Tier XVI, das vorher schon den hohen Titer für normales Serum gezeigt hatte, stieg derselbe nach Injektion von 0.1 grm Nukleoproteid innerhalb 5 Tagen auf 1:500. Serum des Tieres XVII ergab nach Vaccination von 0.05 grm Choleranukleoproteid einen Titer von 1:100, während der Titer bei Serum XVIII wieder 1:300 war.

Nr. und Art des verwandten Kaninchenserums	Dauer der Beobachtg. bei 37° C.	1:5	1:10	1:20	1:30	1:50	1:70	1:100	1:200	1:300	1:500	1:700	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000
		1:5	1:10	1:20	1:30	1:50	1:70	1:100	1:200	1:300	1:500	1:700	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000
Serum von Tier XVI nach einer Injektion von 0.1 grm Choleranukleoproteid, 26. X. bis 1. XI.	30 Minuten	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 Stunde	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Serum von Tier XVII nach einer Injektion von 0.05 grm Choleranukleoproteid. Behandlungszeit 26. X.—2. XI.	30 Minuten	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 Stunde	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Serum v. Tier XVIII nach einer Injektion von 0.1 grm Choleranukleoprot., welches 3 Monate mit Kampfer aufbewahrt war. Behandlung: 8 Tage.	30 Minuten	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 Stunde	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Bei den Immunisierungen war ich zuerst nur mit kleinen Dosen vorgegangen, als ich aber sah, daß selbst 0.1 grm Vaccin gut vertragen wurde, wandte ich öfters diese Dosis an. Tier VII hatte nur 0.025 grm Vaccin mit zwei Injektionen erhalten, das Serum zeigte aber selbst nach dieser kleinen Dosis schon einen Titer von 1:70.

Nr. und Art des verwandten Kaninchenserums	Dauer der Beobachtung bei 37° C.	1:5	1:10	1:20	1:30	1:50	1:70	1:100	1:200	1:300	1:500	1:700	1:1000	1:2000
		1:5	1:10	1:20	1:30	1:50	1:70	1:100	1:200	1:300	1:500	1:700	1:1000	1:2000
Serum von Tier VII nach zwei Injektionen von 0.025 grm Nukleoproteid. Dauer der Behandlung: 10. V. bis 17. V. 05.	30 Minuten	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 Stunde	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	2 Stunden	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—

Ganz bedeutend stieg dann der Wert bei fortschreitender Immunisierung, und verweise ich — der besseren Übersicht wegen — auf die angefügten Tabellen. Herausgreifen möchte ich nur den hohen Wert des Serums I, das durch Impfung von 0.526 grm Vaccin schon einen Titer von 1:5000 aufwies.

Nr. und Art des verwandten Kaninchenserums	Dauer der Beobachtg. bei 37° C.	1:5	1:10	1:20	1:30	1:50	1:70	1:100	1:200	1:300	1:500	1:700	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000	1:10000	Kontrolle
Serum von Tier I. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.876 ^{grm.} Dauer der Behandlung: 5. V. bis 28. VI. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Serum von Tier I. Menge des injizierten Vaccins 0.526 ^{grm.} Dauer der Behandlung: 5. V. bis 24. VII. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Serum von Tier II. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.126 ^{grm.} Behandlung vom 5. V. bis 29. V. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Serum von Tier II. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.126 ^{grm.} Dauer d. Behandlung: 5. bis 29. V. 05, seitdem bis z. 3. V. 05 keine Inj. mehr	30 Min.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Serum von Tier VI. Nach einer Gesamtmenge von 0.23 ^{grm.} Vaccin. Dauer d. Behandlg.: 10. V. - 23. VI. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Serum von Tier VII. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.33 ^{grm.} Dauer d. Behandlg.: 10. V. - 23. VI. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Serum von Tier VII. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.53 ^{grm.} Dauer d. Behandlg.: 10. V. - 27. VII. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Serum von Tier IX. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.27 ^{grm.} Dauer d. Behandlg.: 5. VI. - 19. VII. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Serum von Tier IX. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.37 ^{grm.} Dauer d. Behandlg.: 3. VI. - 27. VII. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Serum von Tier X. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.28 ^{grm.} Dauer d. Behandlg.: 5. VI. - 24. VII. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Serum von Tier XI. Gesamtmenge des injizierten Vaccins 0.255 ^{grm.} Dauer d. Behandlg.: 13. VI. - 22. VII. 05	30 Min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Gegenüber den Werten der Sera, die von Tieren erhalten sind, welche mit Cholera vibrios immunisiert sind, bleiben die angegebenen Resultate allerdings zurück, dagegen konnten bei der Feststellung der bakteriziden Titer dieser Sera sehr hohe Werte gefunden werden. (Vgl. Tabelle S. 201.)

B. Bakterizide Plattenversuche.

Das frisch gewonnene Serum wurde von mir zuerst auf seine bakterizide Wirkung in vitro geprüft. Nach Bordet löst die Peritonealflüssigkeit oder das frische Blutserum immunisierter Tiere leicht die Transformation in Granula aus. Im frischen Blutserum sind wie bekannt zwei Körper vorhanden, die in ihrem Zusammenwirken Bakteriolyse erzeugen, der Zwischenkörper (Ambozeptor, Substance sensibilisatrice) und das Alexin (Buchner) oder Komplement, während das Bakterium verschiedene Rezeptoren besitzt. Der Ambozeptor hat zwei verschiedene Affinitäten, die eine zum Rezeptor des Bakteriums, die andere zum Alexin. Wirken diese beiden Substanzen zusammen, so tritt beim Bakterium Bakteriolyse ein, d. h. die Bakterien werden in Granula verwandelt und lösen sich auf. Der Zwischenkörper findet sich besonders im Serum immunisierter Tiere, ist hitzebeständig (56°) und ist charakteristisch für Immunsera. Die andere Substanz, Alexin oder Komplement, existiert in jedem frischen Normalserum, ebenso in dem immunen Tiere. Sie ist nicht hitzebeständig und verschwindet nach einiger Zeit. Für sich allein ist das Alexin wenig wirksam auf Bakterien, wird es aber in hohem Grade, wenn die Zwischenkörper und das Komplement zusammenwirken.

Von dieser Ansicht ausgehend mußte das durch Immunisierung mit Choleranukleoprotein erhaltene frische Serum der Tiere auch imstande sein, auf eine bestimmte Bakterienmenge reduzierend zu wirken und somit einen Anhalt geben für dessen bakteriolytische Kraft.

Bei der Ausführung meiner Versuche ging ich folgendermaßen vor:

Eine Öse einer 18 stündigen Choleraagarkultur wurde mit 1 ^{cem} 0.8-prozentiger Kochsalzlösung gut vermischt. Dieses ergab die Original-emulsion, von der ich vier Verdünnungen in je 10 ^{cem} Gelatine machte und davon Platten goß. Zur Herstellung der einzelnen Gelatinemischungen verwandte ich einen Platinlöffel, der genau 0.12 ^{gramm} faßte und vor jeder Manipulation frisch abgeglüht wurde. Einen Löffel der Original-emulsion übertrug ich nun auf 10 ^{cem} Gelatine; dieses ergab Gelatine I. Von dieser ersten Gelatinemischung wurde wieder ein Löffel auf 10 ^{cem} Gelatine übertragen, und so wurden analog die vier Verdünnungen hergestellt. Diese Plattenreihen wurden viermal angelegt und 2 Tage bei einer Temperatur von 22° C. belassen. Darnach wurde auf der Platte IV die Zählung vor-

genommen und die Mitte der erhaltenen Zahlen als Grundzahl für meine Versuche festgesetzt. Der Übersicht wegen runde ich hier im Text die Zahlen ab. Inwieweit nun eine Verminderung der Kolonienzahl durch Einwirkung von Immunserum eintrat, werden die von mir angestellten Versuche zeigen.

Ehe ich jedoch die Versuche mit Immunserum begann, überzeugte ich mich erst von der Einwirkung normalen Kaninchenserums und fand, daß auch durch dieses schon eine Reduktion der Keime veranlaßt wurde.

Vorausschicken möchte ich hier noch, daß bei den Versuchen mit Serum die Originalemulsion so hergestellt wurde, daß 0.1^{cem} Serum + 0.9^{cem} Kochsalzlösung, 0.2^{cem} + 0.8^{cem} oder 0.3^{cem} Serum + 0.7^{cem} Kochsalzlösung vermischt wurden, ehe die Öse Cholerakultur hineingebracht wurde, so daß immer die Mischung 1^{cem} als Summe ergab. Während ich bei den Versuchen mit Normalserum Zusätze von 0.1, 0.2 und 0.3^{cem} Serum wählte, verminderte ich diese Dosis auf 0.1, 0.05, 0.01 und 0.005^{cem} bei Anwendung von Immunserum. Diese Emulsionen wurden dann 1/2 Stunde bei 37°C. im Brutraum belassen, und danach die verschiedenen Verdünnungen wie oben erwähnt, angefertigt.

0.1^{cem} Normal-Kaninchenserum reduzierte unter den gleichen Verhältnissen die Keimzahl von 325 Millionen auf 107 Millionen, 0.2^{cem} desselben Normalserums auf 22 Millionen und 0.3^{cem} Normalserum auf 1 Million.

Ganz bedeutend zeigt sich die Verminderung der Keimzahl bei Zusatz von Immunserum und verweise ich der besseren Übersicht wegen auf die angefügten Tabellen. Serum II zum Beispiel führte noch in einer Verdünnung von 0.005^{cem} eine Reduktion der Kolonienzahl von 325 Millionen auf 33 Millionen herbei; während die gleiche Menge Serum VI die ursprüngliche Zahl auf 84 Millionen reduzierte. Serum XI bewirkte noch in der Verdünnung von 1:100 eine Herabsetzung der Keime um 30 Millionen.

Aus den angeführten Beispielen ist also klar ersichtlich, daß das frische Immunserum von mit Choleranukleoproteid behandelten Tieren schon in vitro erhebliche bakterizide Eigenschaften besitzt. (Vgl. Tabelle S. 204.)

Anfügen möchte ich hier noch einen Versuch, der dem vorigen analog gemacht wurde, bei dem aber anstatt Kochsalzlösung Bouillon zur Herstellung der Originalemulsion verwandt wurde. Auch gebrauchte ich hier zum Anlegen der verschiedenen Verdünnungen einen größeren Platinlöffel von 0.4^{cem} Inhalt. Es wurden den Originalemulsionen je 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 und 0.001^{cem} vom Immunserum VII zugefügt. Diese Mischungen wurden wie die oben erwähnten in den Brutraum einer

Tabelle der bakteriziden Plattenversuche,
angelegt mit frischem Serum von Kaninchen, die mit Choleranukleoproteid
immunisiert waren.

Art des Kaninchen-serums	Art der Emulsion u. Menge des Serum-zusatzes	Dauer der Einwirkung bei 37° C.	Platte I 0.12 ccm Emulsion + 10 ccm Gelatine = Gelatine I	Platte II 0.12 ccm d. Gelat. I + 10 ccm Gelatine = Gelat. II	Platte III 0.12 ccm Gelatine II + 10 ccm Gelatine = Gelat. III	Platte IV 0.12 ccm Gelatine III + 10 ccm Gelatine = Gelat. IV
Kein Serum.	1 Öse 18 stündiger Cholera- kultur + 1 ccm 0.7proz. NaCl-Lösung	30 Min.	324 076 334	3 889 160	46 670	560
	1 Öse Cholera- kultur + 0.1 ccm Serum + 0.9 ccm NaCl-Lösung	"	107 430 500	1 289 166	15 470	331
	1 Öse Cholera- kultur + 0.2 ccm Serum + 0.8 ccm NaCl-Lösung	"	20 312 500	243 750	2 925	35
Normal-Kaninchenserum.	1 Öse Cholera- kultur + 0.3 ccm Serum + 0.7 ccm NaCl-Lösung	"	975 000	11 700	195	18
	0.1 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 0.9 ccm NaCl-Lösung	"	95 500	1 075	133	7
	0.05 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung	"	11 250 000	135 000	1 400	20
Serum II nach Behand- lung mit 0.126 ccm Chole- ranukleoproteid.	0.01 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung	"	22 500 000	270 000	3 240	39
	0.005 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung	"	33 194 416	398 333	4 780	57
	0.1 ccm Serum VI + 1 Öse Cholera- kultur + 0.9 ccm NaCl-Lösung	"	2 388 833	28 666	344	8
Serum VI nach Behand- lung mit 0.23 ccm Chole- ranukleoproteid.	0.05 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung	"	5 187 500	62 250	747	17
	0.01 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung	"	39 236 083	470 833	5 650	67
	0.005 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung	"	84 166 000	990 000	11 880	142
Serum IX nach Be- handlung mit 0.27 ccm Choleranukleoproteid.	0.1 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 0.9 ccm NaCl-Lösung	"	731 250	8 775	145	5
	0.05 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung	"	1 077 916	12 935	650	9
	0.01 ccm Serum + 1 Öse Cholera- kultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung	"	56 875 000	682 500	8 190	98

(Fortsetzung.)

Art des Kaninchen-serums	Art der Emulsion u. Menge des Serum-zusatzes	Dauer der Einwirkung bei 37° C.	Platte I 0.12 ccm Emulsion + 10 ccm Gelatine = Gelatine I	Platte II 0.12 ccm d. Gelat. I + 10 ccm Gelatine = Gelat. II	Platte III 0.12 ccm Gelatine II + 10 ccm Gelatine = Gelat. III	Platte IV 0.12 ccm Gelatine III + 10 ccm Gelatine = Gelat. IV
Serum X nach Behandlung mit 0.28 ^{ccm} Choleranukleoproteid.	0.1 ccm Serum	30 Min.	1 250 000	150 000	1 800	42
	+1 Öse Cholerakultur + 0.9 ccm NaCl-Lösung					
	0.05 ccm Serum	„	41 250 000	495 000	5 940	71
	+1 Öse Cholerakultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung					
	0.01 ccm Serum	„	150 000 000	1 800 000	21 600	259
	+1 Öse Cholerakultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung					
Serum XI nach Behandlung mit 0.255 ^{ccm} Choleranukleoproteid.	0.1 ccm Serum	„	341 250	4 095	50	—
	+1 Öse Cholerakultur + 0.9 ccm NaCl-Lösung					
	0.05 ccm Serum	„	3 004 160	36 050	432	8
	+1 Öse Cholerakultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung					
	0.01 ccm Serum	„	5 097 166	61 166	734	12
	+1 Öse Cholerakultur + 1.0 ccm NaCl-Lösung					

Art des Serums	Zubereitung der Emulsion	Serummenge in ccm	Dauer der Einwirkung bei 37° C.	Platte I 0.4 ccm Emulsion + 10 ccm Gelatine = Gelatine I	Platte II 0.4 ccm Gelatine I + 10 ccm Gelatine = Gelat. II	Platte III 0.4 ccm Gelatine II + 10 ccm Gelatine = Gelat. III	Platte IV 0.4 ccm Gelatine III + 10 ccm Gelatine = Gelat. IV
Kontrolle wurde 3mal angefertigt u. davon die Mittelzahl angenommen.	1 Öse 18 stündig. Choleragarkultur + 1.1 ccm Bouillon	ohne Serumzusatz	—	317 653 125	60 706 125	1 814 125	532 565
Immunserum von Tier VII nach Impfung von 0.33 ^{ccm} Choleranukleoproteid.	1 Öse 18 stündig. Choleragarkultur + 1.0 ccm Bouillon	0.1	20 Min.	1 120 790	31 625	1 105	130
			1 Std.	2 025 000	87 750	3 510	214
	desgl.	0.05	20 Min.	5 321 875	212 875	10 515	1 300
			1 Std.	152 343 750	6 093 750	243 750	9 750
	desgl.	0.01	20 Min.	6 425 735	315 650	13 265	2 560
			1 Std.	167 390 625	6 215 625	248 625	9 945
	desgl.	0.005	20 Min.	115 843 750	4 533 750	181 350	7 254
			1 Std.	228 515 625	9 540 625	365 625	14 625
	desgl.	0.001	20 Min.	Unzählige Kolonien.			
			1 Std.				

Temperatur von 37° C. ausgesetzt und davon sowohl nach 20 Minuten wie nach 1 Stunde in der beschriebenen Weise Plattenserien angefertigt. Hier zeigte sich durch den Zusatz von 0.005^{ccm} Serum VII nach 1 Stunde noch eine Verminderung der Keimzahl um 600 Millionen, während ein Zusatz von 0.001^{ccm} nicht mehr ausgereicht hatte, bakteriziden Einfluß auszuüben, so daß die Keime sich sehr schnell vermehren konnten und schon nach 20 Minuten eine nicht mehr festzustellende Zahl angenommen hatten. (Vgl. Tabelle S. 205.)

C. Auswertung der durch Immunisierung mit Choleranukleoprotein erhaltenen Sera im Pfeifferschen Versuch.

Speziellen Wert legte ich bei der Beurteilung meiner Immunsera auf die Bestimmung des Titers im Pfeifferschen Versuch.

Pfeiffer und Wassermann, welche die Immunisierungsvorgänge an aktiv immunisierten Meerschweinchen studierten, zeigten, daß im Serum von Tieren, die mit lebenden oder abgetöteten Cholerakulturen behandelt waren, ganz bestimmte Stoffe auftreten, die sonst nicht in demselben zu finden sind. Der Hauptverdienst gebührt aber R. Pfeiffer, der unwiderleglich feststellte, daß die Choleraimmunität durch spezifische bakteriolytische Substanzen bedingt wird, welche imstande sind, Cholera-vibrien im Tierkörper aufzulösen. Jetzt wird diese Eigenschaft der Cholera-bakteriolytine auch allgemein zur Differentialdiagnose der Cholera-vibrien von ähnlichen Bakterien benutzt und ist als Pfeifferscher Versuch überall angewandt. Der Immunisierungswert eines Choleraserums beruht also auf dem Gehalt an spezifischen Bakteriolytinen. Die Wertbestimmung der Schutzkraft fällt deshalb zusammen mit der Bestimmung des Gehaltes an Bakteriolytinen und wird am sichersten im Pfeifferschen Versuch ermittelt.

Pfeiffer benutzt zur Prüfung des Choleraimmunserums eine Cholerakultur, von der 0.4 bis 0.2^{mg} der 20 stündigen Agarkultur ausreichen, um ein Meerschweinchen von 200^{gmm} innerhalb 24 Stunden bei intraperitonealer Einspritzung zu töten. Eine derart wirksame Kultur wird als „Normalvirus“ bezeichnet. Als „Titer“ des Serums wird diejenige Serumquantität angenommen, welche gerade ausreicht, 2^{mg} des eben genannten Normalvirus innerhalb 1 Stunde zur Auflösung zu bringen, wenn sie, in 1^{ccm} Bouillon mit der Choleradosis gemischt, in das Peritoneum eines Meerschweinchens von 200^{gmm} Gewicht injiziert wird.

Zu meinen Versuchen wurden Meerschweinchen von ca. 300^{gmm} benutzt. Die zur Verwendung gelangende Cholerakultur wurde uns durch

die Liebenswürdigkeit des Hrn. Prof. Kolle vom Berliner Institut für Infektionskrankheiten zur Verfügung gestellt. Die verschiedenen Stämme waren von Cholera-kranken des letzten Jahres isoliert und zeigten hohe Virulenz. $\frac{1}{5}$ bzw. $\frac{1}{6}$ Normallöse pro 100^{grm} Tiergewicht genügten, um Meerschweinchen von 300^{grm} innerhalb 24 Stunden eines sterilen Cholera-todes sterben zu lassen. Die Virulenz wurde häufig geprüft und durch Tierpassagen auf gleicher Höhe gehalten.

Zum Zweck der Serumgewinnung wurde den Immuntieren Blut teils von der Ohrvene, teils von der Carotis entnommen und die Wertigkeit der erhaltenen Sera im Pfeifferschen Versuch ausstitriert. Zuerst bestimmte ich den Titer verschiedener Normal-Kaninchenserum und fand Bestätigung der von Kolle gemachten Angaben. 0.2 bis 0.3^{ccm} der Normalsera genügten, um eine Normallöse Cholera-vibrien binnen 1 Stunde im Peritoneum von Meerschweinchen zur Auflösung zu bringen.

Bakterizider Titer normaler Sera nach Kolle:

Pferd	0.005—0.010
Esel	0.010—0.020
Ziege	0.020—0.050
Kaninchen	0.100—0.300

Eigene Versuche.

Bestimmung des bakteriziden Titers von Normal-Kaninchenserum XII im Pfeifferschen Versuch. 19. Juni 1905.

Meerschw.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
I	0.1 ^{ccm} Serum + 0.9 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	lebhaft beweg- liche Vibrien	Granula, daneben zahlreich beweg- liche Vibrien	† nach 24 Stunden
II	0.2 ^{ccm} Serum + 0.8 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Granula neben beweglichen Vibrien	keine Vibrien mehr sichtbar, zahlr. Granula	Titer dieses Normal- Kaninchen- serums ist 0.2 ccm
III	0.3 ^{ccm} Serum + 0.7 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Sehr wenig Vibrien, Granula	keine Vibrien, sehr wenig Granula	
IV Kontrolle	1 Öse Cholerakultur + 1 ^{ccm} Bouillon kein Serumzusatz		lebhaft beweg- liche Vibrien	† nach 22 Stunden

Bestimmung des bakteriziden Titers von Normal-Kaninchenserum XIII
im Pfeifferschen Versuch. 7. November 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
I	0.1 ccm Serum + 0.9 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	lebhaft beweg- liche Vibrionen	lebhaft beweg- liche Vibrionen	† am 8. XI.
II	0.2 ccm Serum + 0.8 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	lebhaft bewegl. Vibrion., daneben einige Granula	Granula, daneben lebhaft beweg- liche Vibrionen	desgl.
III	0.3 ccm Serum + 0.7 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Granula, daneben beweg- liche Vibrionen	Granula, keine bewegl. Vibrion. sichtbar	Titer dieses Normal- Kaninchen- serums ist 0.3 ccm
IV	0.4 ccm Serum + 0.6 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Granula, einige bewegl. Vibrionen	wenig Granula, Vibrionen nicht mehr sichtbar	
V Kontrolle	1 Öse Cholerakultur + 1 ccm Bouillon kein Zusatz v. Serum	lebhaft beweg- liche Vibrionen	lebhaft beweg- liche Vibrionen	† am 8. XI.

Bestimmung des bakteriziden Titers von Normal-Kaninchenserum XIV
im Pfeifferschen Versuch. 14. November 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
VI	0.1 ccm Serum + 0.9 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	lebhaft bewegl. Vibrionen	lebhaft bewegl. Vibrionen, einige Granula	† am 15. XI.
VII	0.2 ccm Serum + 0.8 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	Granula, sehr wenig bewegl. Vibrionen	Titer dieses Normal- Kaninchen- serums ist 0.25 ccm
VIII	0.25 ccm Serum + 0.75 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Granula, daneben bewegl. Vibrionen	Granula, keine Vibrionen	
IX	0.3 ccm Serum + 0.7 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	desgl.	
X	0.4 ccm Serum + 0.6 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	desgl.	
XI Kontrolle	1 Öse Cholerakultur + 1 ccm Bouillon kein Serumzusatz	lebhaft bewegl. Vibrionen	lebhaft bewegl. Vibrionen	† am 15. XI.

Schon eine einmalige Vaccininjektion von 0.05 bis 0.1 ^{gmm} genügte, um eine bedeutende Erhöhung der bakteriziden Eigenschaften der betreffenden Blutsera zu erzielen. Der Zeitraum zwischen Impfung und Blutentnahme betrug in einem Falle 7, in zwei anderen 8 Tage. Der höchste Wert in dieser Versuchsreihe, der Titer 0.005, wurde mit dem Serum des Tieres XVI erzielt.

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Kaninchens XVI.
Blutentnahme 7 Tage nach einmaliger Injektion von 0.1 ^{grm} Cholera-
nukleoproteid. 3. November. 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
I	0.05 cem Serum XVI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	geringe Bewe- gung, sehr viel Granula	wenig Granula	Titer des Serums XVI nach einer Injektion von 0.1 ^{grm} Proteid ist 0.005
II	0.01 cem Serum XVI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Beweglichkeit noch vorhanden, daneben Granula	Granula, keine Vibrionen sichtbar	
III	0.005 cem Ser. XVI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	viel Granula, keine Vibrionen	
IV Kontrolle	1 Öse Cholerakultur + 1 cem Bouillon kein Serum	lebhaft Beweglichkeit	lebhaft Beweglichkeit	

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Kaninchens XVII.
Blutentnahme 8 Tage nach einmaliger Injektion von 0.05 ^{grm} Cholera-
nukleoproteid. 4. November. 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
I	0.05 cem Ser. XVII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Granula, daneben Beweglichkeit	Granula, keine Vibrionen	Titer des Serums XVII ist 0.01
II	0.01 cem Ser. XVII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Granula und bewegliche Vibrionen	desgl.	
III	0.005 cem Ser. XVII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	lebhaft Beweglichkeit	Granula, aber sehr starke Beweglichkeit	

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Kaninchens XVIII.
Blutentnahme 8 Tage nach einmaliger Injektion von 0.1 ^{grm} Cholera-
nukleoproteid, das 3 Monate mit Kamphor 1:1 verrieben aufbewahrt war.
11. November. 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
I	0.05 cem Ser. XVIII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	wenig Granula, bewegliche Vibrionen	Granula, keine Vibrionen	Titer des Serums XVIII ist 0.05
II	0.01 cem Ser. XVIII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	bewegliche Vibrionen, Granula	viel Granula, daneben wenige bewegl. Vibrion.	
III	0.005 cem Ser. XVIII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	Granula neben lebhaft bewegl. Vibrionen	

Bei fortschreitender Immunisierung erhöhten sich die Werte der Sera ganz bedeutend. Den höchsten Wert erzielte ich bei Tier VII. Hier waren schon 0.0008^{cem} Serum genügend, um 1 Öse Cholerakultur binnen 1 Stunde aufzulösen. Dieses Tier hatte auch bei der sich über 2 $\frac{1}{2}$ Monate erstreckenden Immunisierung nie mit größeren Temperaturschwankungen reagiert, sondern war bis zum Tage der totalen Entblutung normal geblieben. Ich vermeide es hier, die einzelnen Resultate anzuführen, die nachstehenden Protokolle werden die beste Übersicht über diese Versuche bieten. Leider wurde ich durch den Beginn der Universitätsferien daran gehindert, die Immunisierung an den Tieren fortzusetzen, doch bin ich der Überzeugung, noch höhere Werte bei deren Fortsetzung erlangt haben zu können. So beschränkte ich mich, die Immuntiere zu entbluten und die erhaltenen Sera in sterile kleine Fläschchen einzuschmelzen, um im beginnenden Wintersemester Material für weitere Versuche zu haben.

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres I
nach Injektion von 0.376^{gcm} Choleranukleoproteid. Dauer der Behandlung vom 5. Mai bis 27. Juni. 27. Juni 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
V	0.02 ^{cem} Serum I +1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Vibrionen fast ohne Bewegung, Agglutinations- klumpen, Granula	Vibrionen nicht mehr sichtbar, wenig Granula	Titer des Serums I ist 0.002
VI	0.005 ^{cem} Serum I +1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Vibrionen noch sichtbar	Vibrionen nicht mehr sichtbar	
VII	0.002 ^{cem} Serum I +1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	wenig Vibrionen noch i. Bewegung teilweise Bildung von Granula	desgl.	
VIII	0.001 ^{cem} Serum I +1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	zahlr. Vibrionen sichtbar	Vibrionen noch sichtbar	bleibt am Leben
IX Kontrolle	1 Öse Cholerakultur +1.0 ^{cem} Bouillon kein Serumzusatz	zahlreiche Vibrionen sichtbar		† nach 24 Stunden

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres I nach Injektion von 0.526^{grm} Choleranukleoproteid. Dauer der Behandlung vom 5. Mai bis 24. Juli. 27. Juli 1905.

Meerschw.-Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
X	0.002 ccm Serum I + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	sehr wenige Vibrionen, Granula	Granula, keine Vibrionen	Titer des Serums I ist 0.001
XI	0.001 ccm Serum I + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	wenig bewegliche Vibrionen, Granula	keine Vibrionen, nur Granula	
XII	0.0005 ccm Serum I + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	bewegliche Vibrionen	bewegliche Vibrionen neben Granula	

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres II nach Injektion von 0.126^{grm} Choleranukleoproteid. Seit der letzten Injektion sind 39 Tage vergangen. Dauer der Behandlung 5. bis 29. Mai. 11. Juli 1905.

Meerschw.-Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
XIII	0.1 ccm Serum II + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Fast alle Vibr. verschwinden, Granula	keine Vibrionen sichtbar	Titer des Serums II ist 0.05
XIV	0.05 ccm Serum II + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	einige bewegliche Vibrionen neben Granula	keine Vibrionen sichtbar, Granula	
XV	0.01 ccm Serum II + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	zahlr. Vibrionen sichtbar	Vibrionen sichtbar	bleibt am Leben
XVI	0.005 ccm Serum II + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	zahlreiche Vibrionen sichtbar		† nach 22 Stunden

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres VI nach Injektion von 0.23^{grm} Choleranukleoproteid. Dauer der Behandlung vom 10. Mai bis 23. Juni. 18. Juli 1905.

Meerschw.-Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
XVII	0.01 ccm Serum VI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	sehr wenig Vibrionen, Granula	keine Vibrionen, wenig Granula	Titer des Serums VI ist 0.003
XVIII	0.005 ccm Serum VI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	wenig Vibrionen neben Granula	desgl.	
XIX	0.003 ccm Serum VI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	bewegliche Vibrionen noch sichtbar	keine Vibrionen, Granula	
XX	0.001 ccm Serum VI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	zahlr. Vibrionen sichtbar	wenig Vibrionen in Bewegung, daneben Granula	Tier bleibt am Leben

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres VII
nach Injektion von 0.33^{erm} Choleranukleoproteid. Dauer der Behandlung
vom 10. Mai bis 23. Juni 1905. 7. Juli 1905.

Meerschw.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
XXI	0.1 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	keine Vibrionen, alles Granula	keine Vibrionen, nur wenig Granula, alles aufgelöst	Titer des Serums VII ist 0.002
XXII	0.05 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	alles in Granula verwandelt	nur Granula, keine Vibrionen	
XXIII	0.01 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Vibrionen noch vorhanden, doch wenig beweglich, Granula	Vibrionen nicht mehr sichtbar, nur Granula	
XXIV	0.005 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Vibrionen noch vorhanden	keine Vibrionen, Granula	
XXV	0.002 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	Granula, keine Vibrionen sichtbar	
XXVI	0.001 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	Granula, daneben noch bewegliche Vibrionen	+ nach 22 Stunden

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres VII
nach Injektion von 0.53^{erm} Choleranukleoproteid. Dauer der Behandlung
vom 10. Mai bis 27. Juli 1905. 31. Juli 1905.

Meerschw.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
XXVII	0.01 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	keine beweglich. Vibrionen mehr sichtbar	Vibrionen nicht mehr sichtbar, sehr wenig Granula	Titer des Serums VII ist 0.0008
XXVIII	0.001 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	wenig Vibrionen, Granula	keine Vibrionen sichtbar	
XXIX	0.0008 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Vibrionen sicht- bar, Granula	keine Vibrionen sichtbar, Granula	
XXX	0.0005 ccm Serum VII + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Vibrionen noch sichtbar	Vibrionen neben zahlreichen Granula	Tier bleibt nach schwerer Infektion am Leben

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres IX
nach Injektion von 0.37^{grm} Choleranukleoproteid. Dauer der Behandlung
vom 5. Juni bis 29. Juli 1905. 29. Juli 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
XXXI	0.01 cem Serum IX + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	wenig Vibrionen, Granula	keine Vibrionen, sehr wenig Granula	Titer des Serums IX ist 0.003
XXXII	0.005 cem Serum IX + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	keine Vibrionen	
XXXIII	0.003 cem Serum IX + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	Vibrionen noch vorhanden	keine Vibrionen, Granula	
XXXIV	0.001 cem Serum IX + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	bewegliche Vibr. noch vorhanden, Granula	† nach 26 Stunden

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres X
nach Injektion von 0.28^{grm} Choleranukleoproteid. Dauer der Behandlung
vom 5. Juni bis 24. Juli 1905. 25. Juli 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
XXXV	0.01 cem Serum X + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	wenig Vibrionen, Granula	keine Vibrionen	Titer des Serums X ist 0.008
XXXVI	0.008 cem Serum X + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	bewegliche Vibrionen noch vorhanden	keine Vibrionen, Granula	
XXXVII	0.005 cem Serum X + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	Granula, daneben beweg- liche Vibrionen	Tier bleibt am Leben

Bestimmung des bakteriziden Titers vom Serum des Tieres XI
nach Injektion von 0.255^{grm} Choleranukleoproteid. Dauer der Behand-
lung vom 13. Juni bis 22. Juli 1905. 22. Juli 1905.

Meersch.- Nr.	Menge des verwandten Serums	Befund nach 30 Minuten	Befund nach 1 Stunde	Bemerkungen
XXXVIII	0.01 cem Serum XI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	wenig Vibrionen, Granula	keine Vibrionen, wenig Granula	Titer des Serums XI ist 0.009
XXXIX	0.009 cem Serum XI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	keine Vibrionen, Granula	
XL	0.0075 cem Serum XI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	bewegliche Vibrionen	sehr wenig be- wegliche Vibr., Granula	† nach ca. 24 Stdn.
XLI	0.005 cem Serum XI + 1.0 „ Bouillon + 1 Öse Cholerakultur	desgl.	bewegliche Vibrionen, Granula	

D. Versuche über Schutzwirkung durch Serum, das von Tieren gewonnen war, welche mit Choleranukleoproteid immunisiert worden waren.

Lazarus war der erste, welcher nachwies, daß das Serum von Menschen, die eben eine Choleraerkrankung überstanden haben, imstande ist, Tiere gegen sonst tötliche Dosen virulenter Cholera-vibrien zu schützen. Pfeiffer und Wassermann konnten diese Behauptung bestätigen, und es gelang ihnen, Meerschweinchen durch das Serum aktiv immunisierter Tiere auch vor der sonst letalen Dosis virulenter Cholera-kultur zu schützen. Ihrer Ansicht nach beruht diese Erscheinung auf der bakteriolytischen Eigenschaft der Immunsera. Wären Choleraantitoxine in dem Serum immunisierter Tiere vorhanden, dann müßte zwischen der Höhe der Giftdosis und der zur Neutralisation der Giftwirkung nötigen Serummenge ein bestimmtes zahlenmäßiges Verhältnis sich zeigen, wie dieses bei Diphtheriegift und Antitoxin der Fall ist.

In der im Jahre 1893 erschienenen Arbeit¹ „Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität“ schreiben Pfeiffer und Wassermann folgendermaßen: „Es wollte auf keine Weise gelingen, bei den von uns verwendeten Versuchstieren antitoxische Funktionen des Blutserums zu erzielen. Wir konnten feststellen, daß in der Tat, den Angaben Lazarus entsprechend, Bruchteile eines Milligramms von diesem Serum genügten, um Meerschweinchen gegen eine sonst absolut letale Dosis der lebenden Cholera-vibrien zu schützen. Derart vorbehandelte Tiere vertrugen 1 Öse fast reaktionslos.“

Wenn man Meerschweinchen die 3 fache, die 10 fache oder 100 fache Quantität derjenigen Serummenge injiziert, welche gerade gegen eine Öse der lebenden Cholera-kultur Schutz verleiht, dann vertragen diese Tiere nicht etwa 3, 10 oder 100 Ösen, sondern es gibt eine obere Grenze der Giftdosis, die auch bei Injektion der größten Serum-mengen nicht überschritten werden darf, dieselbe beträgt nach unseren Erfahrungen etwa 1 Öse pro 100 ^{gmm} Tiergewicht.“

Von mir wurde nun geprüft, ob diese Behauptungen auch für das von mir mit Hilfe von Choleranukleoproteid gewonnene Immunserum Gültigkeit hätten. Wie meine Versuche zeigen werden, stimmen die von mir erhaltenen Resultate nicht mit den vorher erwähnten von Pfeiffer und Wassermann überein, vielmehr konnte ich feststellen, daß die mit Choleranukleoproteidserum immunisierten Tiere eine weit höhere Giftdosis vertrugen als 1 Öse pro 100 ^{gmm} Tiergewicht, wie die nachfolgenden Tabellen zeigen.

¹ Diese Zeitschrift. Bd. XIV. S. 55.

Bei den Versuchen wurden Meerschweinchen mit wechselnden Dosen Immunsérum teils intraperitoneal, teils subkutan präventiv behandelt. Die Infektion mit virulenter 18 stündiger Choleraagarkultur erfolgte gewöhnlich nach 24 Stunden. Die Kontrolltiere erhielten einerseits die einfache tödliche Dosis oder die analoge Dosis wie die Versuchstiere, damit man aus der Länge der Krankheit und dem Sektionsbefund einen Vergleich zwischen den Versuchstieren und den Kontrolltieren ziehen konnte; anderseits bekamen verschiedene Kontrolltiere die gleichen Dosen Normal-Kaninchensérum wie die Versuchstiere. Sodann ist bekannt, daß selbst indifferente Flüssigkeiten, wie physiologische Kochsalzlösung und Bouillon in das Peritoneum injiziert, dort Leukozytose hervorrufen, die imstande ist, eine größere Menge virulenter Bakterien als die tödliche Dosis unwirksam zu machen. Man bezeichnet diese nicht spezifische Erhöhung der Widerstandskraft bekanntlich als Resistenz. Bezüglich neuerer experimenteller Forschungen auf diesem Gebiete verweise ich auf die Arbeit von Lubomondrov.¹

Ich gab einigen Tieren in bestimmten Zeiträumen vor der Infektion intraperitoneale Injektionen mit 0.8 Prozent Kochsalzlösung und konnte hier auch beobachten, daß ein Tier, welches 5 Stunden vor der Infektion 1^{cem} Kochsalzlösung intraperitoneal bekommen hatte, den Eingriff überlebte, während das Kontrolltier an der gleichen Virusdosis zugrunde ging. Bei kleinerer Menge (1^{cem}) Kochsalzlösung und Einspritzung 24 Stunden vor der Infektion war dagegen die Wirkung nicht mehr zu konstatieren.

Versuch I.

Fünf Tiere erhalten 24 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit je 3 Ösen 18 stündiger virulenter Cholerakultur [das wäre bei dem Tier mit höchstem Gewicht die doppelte tödliche Dosis] je eine Dosis Sérum IX als Schutzimpfung intraperitoneal. Zur Kontrolle werden Tiere mit Normal-sérum und 1^{cem} 0.8 prozent. Kochsalzlösung gespritzt. Außer Tier V, welches nur 0.01^{cem} Cholerasérum IX bekommen hatte, bleiben alle immunisierten Tiere am Leben, während die mit Normal-sérum behandelten Tiere sterben.

¹ Lubomondrov, Action des injections salines. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1905. T. XIX. p. 572.

Nr.	Gewicht in gm	Art des Serums	Zeitraum bis zur Infektion	Virusdosis	Erfolg	Bemerkungen
I	545	0.5 ^{cem} Choleraserum IX intraperitoneal	24 Std.	3 Ösen Cholera- agarkultur 1 Öse = 2 ^{mg} intraperit.	bleibt am Leben	
II	480	0.3 ^{cem} Choleraserum IX + 0.2 „ NaCl-Lösung	„	desgl.	desgl.	
III	400	0.1 „ Choleraserum IX + 0.4 „ 0.8proz. Koch- salzlösung	„	„	„	
IV	500	0.05 „ Choleraserum IX + 0.5 „ 0.8proz. Koch- salzlösung	„	„	„	
V	620	0.01 „ Choleraserum IX + 0.5 „ Kochsalzlösung	„	„	† nach 28 Stunden	Peritoneum steril
VI	580	0.5 „ Normalkaninch.- Serum	„	„	† nach 20 Stunden	im Peritoneum bewegl. Vibrion.
VII	420	0.1 „ Normalkaninch.- Serum + 0.4 „ Kochsalzlösung	„	„	† nach ca. 16 bis 18 Stunden	zahlreich. beweg- liche Vibrionen im Peritoneum
VIII	470	0.02 „ Normalkaninch.- Serum + 0.5 „ Kochsalzlösung	„	„	† nach ca. 18 Std.	desgl.
IX Kon- trolle	600	1.0 ^{cem} 0.8proz. Kochsalz- lösung ohne Serumzusatz intraperitoneal	„	1½ Öse Cholera- kultur = der ein- fachen töd- lichen Dosis	† nach 20 Stunden	im Peritoneum bewegliche Vibrionen

Versuch II.

Bei diesem Versuch erhalten zwei Tiere nur sehr geringe Serumdosen 24 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit der einfachen tödlichen Dosis Cholera-vibrionen. Zur Kontrolle dienen zwei Tiere. Das eine erhält 24 Stunden vor der Infektion 1^{cem} 0.8 prozentiger Kochsalzlösung intraperitoneal, während das andere Tier die tödliche Dosis als Kontrolle bekommt. In der Tat konnte ich an der Hand dieses Versuches die Beobachtung machen, daß schon durch 1^{cem} gewöhnlicher Kochsalzlösung eine Resistenz gegenüber der nach 5 Stunden erfolgenden Infektion mit der Dosis letalis minima virulenter Vibrionen zustande gekommen war, welche das Tier den Eingriff überleben ließ.

Nummer	Ge- wicht in grm	Vorbehandlung	Datum der Schutz- impfung	Datum der Infektion	Zeitraum da- zwischen	Virusdosis	Erfolg	Bemerkungen
I	400	0.001 ^{cem} Serum VII in 1 ^{cem} 0.8proz. Koch- salzlösung intraperitoneal	13. XI. 05	14. XI. 05	24 Stunden	1 Öse (1/4 Öse tödliche Dosis)	bleibt am Leben	Am 14. XI. 05: 4 Stunden nach Injektion Temp. 36° C.
II	350	0.005 ^{cem} Serum VII in 1 ^{cem} Kochsalzlösung intraperitoneal	"	"	"	desgl.	desgl.	Temperaturabfall bis 35.8° C.
III Kontrolle	320	kein Serum	—	"	—	"	† 15. XI. 05	Im Peritoneum bewegliche Vibrien.
IV Kontrolle	350	1 ^{cem} 0.8proz. Kochsalz- lösung intraperitoneal	14. XI. 05	"	5 Stunden	"	bleibt am Leben	Starker Temperatursturz.

Versuch III.

Zwei Tiere erhalten 24 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit der 4fachen tödlichen Dosis Cholera vibrien
als Schutzimpfung 0.5 bzw. 0.1^{cem} Choleraserum X subkutan. Die Kontrolltiere erhalten gleiche Dosen Normalserum.
Die mit Immunserum behandelten Tiere bleiben leben, während die Kontrolltiere sterben.

Nummer	Ge- wicht in grm	Art des Serum	Datum der Schutz- impfung	Datum der Infektion	Zeitraum da- zwischen	Virusdosis	Erfolg	Bemerkungen
I	350	0.5 ^{cem} Choleraserum X subkutan	14. XI. 05	15. XI. 05	24 Stunden	3 Ösen Cholera- in 1 ^{cem} Bouillon = 4fach. tödl. Dos.	bleibt am Leben	Kein bedeutender Tempe- raturabfall zu bemerken.
II Kontrolle	350	0.5 " Normalserum subkutan	"	"	"	desgl.	† am 16. XI. 05	Zahlreiche bewegliche Vibrien im hellen serösen Peritonealexsudat.
III	300	0.1 " Serum X subkutan	"	"	"	"	bleibt am Leben	Temperaturabfall bis zu 35.6° C.
IV Kontrolle	320	0.1 " Normalserum subkutan	"	"	"	"	† am 16. XI. 05	Zahlreiche bewegliche Vibrien im hellen serösen Peritonealexsudat.

Versuch IV.

Vier Meerschweinchen werden am 17. XI. 05 mit vier verschiedenen Dosen Choleraserum IX immunisiert und erhalten am 23. XI, also 6 Tage nach der Schutzimpfung die 4fache tödliche Dosis Choleravibrionen. Kontrolltier erhält 0.5^{cem} Normalserum. Nur ein Tier, welches 0.5^{cem} Immunserum erhalten hatte, blieb leben, während die anderen Tiere unter deutlichen Vergiftungserscheinungen zugrunde gingen. Der Tod trat gegenüber dem Kontrolltier etwas später ein, und war bei der Sektion der typische Befund einer Choleravergiftung zu konstatieren, doch konnten bei den drei Schutzgeimpften Tieren Vibrionen im Peritoneum nicht mehr gefunden werden. Aus den im Inneren des Peritoneums zu beobachtenden Veränderungen ließ sich aber sehr leicht ein Schluß auf die Wirkung des Serums ziehen. In allen Fällen hatte die Serummenge wohl noch gereicht, die Vibrionen aufzulösen, doch waren die Tiere dann infolge Überschwemmung des Körpers mit den in den Choleravibrionen enthaltenen Endotoxinen zugrunde gegangen, da im Blute gewiß nicht mehr genügend neutralisierende Substanzen vorhanden waren.

Nr.	Gewicht in grm	Vorbehandlung	Datum der Schutz- impfung	Datum der Infektion	Zeitraum da- zwischen	Virusdosis	Erfolg	Bemerkungen
I	400	0.5 ^{cem} Serum IX intrapitoneal	17. XI. 05	23. XI. 05 Nachm. 3 Uhr	6 Tage	3 Ösen 4fache tödl. Dosis	bleibt am Leben	Am 24. XI. 05 sehr geringe Temperatur- steigerung noch vorhanden, 38.6° C. Tier sonst normal.
II	320	0.4 ^{cem} Serum IX	"	desgl.	"	desgl.	+ 24. XI. 05 nach 23 Stunden	Sektionsbefund: Stark gerötet. Inguinal- drüsen, eitrig-fibrinöser Belag auf Leber, Magen, Darm. Nebennieren nicht verän- dert. Geringe Leukozytose. In den Leuko- zyten sind sehr viel lichtbrechende Körner zu sehen. Keine Vibrionen. Exsudat trübe.
III	380	0.3 ^{cem} Serum IX	"	"	"	"	+ 24. XI. 05 nach 24 Stunden	Sektionsbefund: Vibrinöser Belag auf Lebern. Magen. Inguinaldrüsen stark infil- triert. Exsudat röthlich, fadenziehend. Viel Leu- kozyten u. Blutkörperchen, keine Vibrionen.
IV	310	0.1 ^{cem} Serum IX	"	"	"	"	+ 24. XI. 05 nach 17 Stunden	Sektionsbefund: Helles Exsudat fast ohne eitrige Belege. Starke Leukozytose. Vibrionen nicht mehr sichtbar.
V Kon- trolle	300	0.5 ^{cem} Normal- serum	"	"	"	"	+ 24. XI. 05 nach 17 Stunden	Sektionsbefund: Inguinaldrüsen blutig infiltriert. Helles seröses Exsudat. Zahl- reiche Vibrionen in lebhafter Bewegung.

Versuch V.

Zwei Tiere erhalten je 1·5^{cem} Immuns Serum II intraperitoneal; nach 24 Stunden erfolgt Infektion mit 8 Ösen Cholerakultur 70 [tödliche Dosis $\frac{1}{16}$ Öse, also hier die 10 fache tödliche Dosis]. Beide Tiere bleiben am Leben und zeigen am folgenden Tage normale Temperatur.

Nr.	Ge- wicht in grm	Vorbehandlung	Datum der Schutz- impfung	Datum der Infektion	Zeitraum da- zwischen	Virusdosis	Erfolg	Bemerkungen
I	550	1·5 ^{cem} Serum II	7. XII. 05	8. XII. 05	24 Stunden	8 Ösen Chole- rakultur 70 = 10 fach. tödl. Dos.	bleibt am Leben	Temperatur vor d. Schutzimpfung 37·0° C. " nach 24 Stunden . . . 37·3° "
II	570	1·5 " Serum II	"	"	"	desgl.	desgl.	24 Std. nach d. Infektion 37·4° " Temperatur vor d. Schutzimpfung 36·7° C. " nach 24 Stunden . . . 37·3° " " 24 Std. nach d. Infektion 37·3° "

Versuch VI.

Drei Tiere erhalten je 1^{cem} Choleraserum II intraperitoneal als Präventivimpfung und nach 24 Stunden erfolgt die Infektion mit je $\frac{2}{3}$ Choleragarkultur = 10 Normalösen = der 16 fachen tödlichen Dosis. Ich lege hier die Berechnung von Pfeiffer¹ zugrunde. Hier wird die auf einem Schrägarührchen innerhalb 18 Stunden gewachsene Kulturmasse mit 30 mg angegeben. Meine Originalöse fällt 2 mg. Mithin sind auf jedem Röhrchen ca. 15 Ösen vorhanden. Ich spülte nun zwei Röhrchen mit 3^{cem} Bouillon ab und injizierte jedem Tier 1^{cem} der erhaltenen Emulsion, mithin ca. 10 Ösen. Sämtliche drei Tiere blieben am Leben. Zwei davon hatten schon nach 24 Stunden ihre normale Temperatur wieder, während ein Tier noch die Temperatur 36·4° zeigte.

Nr.	Ge- wicht in grm	Vorbehandlung	Datum der Schutz- impfung	Datum der Infektion	Zeitraum da- zwischen	Virusdosis	Erfolg	Bemerkungen
I	320	1·0 ^{cem} Chole- raserum II	12. XII. 05	13. XII. 05	24 Stunden	$\frac{2}{3}$ Choleragarkult. = 10 Ösen = 16 fach. tödl. Dosis	bleibt am Leben	Temperatur vor der Behandlung 37·5° C. " 24 Std. nach d. Infektion 37·8° "
II	330	1·0 " Chole- raserum II	"	"	"	desgl.	desgl.	Temperatur vor der Behandlung 37·4° C. " 24 Std. nach d. Infektion 36·4° "
III	300	1·25 " Chole- raserum II	"	"	"	"	"	Temperatur vor der Behandlung 37·3° C. " 24 Std. nach d. Infektion 37·6° "

¹ Untersuchungen über das Choleragift. *Diese Zeitschrift.* Bd. XI, S. 393.

Versuch VII.

Drei Meerschweinchen werden 24 Stunden vor der Infektion mit 2 bzw. 3 ^{ccm} Choleraserum durch intraperitoneale Injektion immunisiert. Die Infektion geschieht mit sehr großen, aber verschiedenen Mengen 18 stündiger virulenter Cholerakultur [2 bis 3 Röhren also ca. 30 bis 45 Ösen pro Tier]. Sämtliche Tiere sterben, doch läßt der Sektionsbefund darauf schließen, daß die Choleravibrionen von dem Organismus der immunisierten Tiere aufgelöst wurden. Infolge der Überschwemmung des Blutes mit den aufgelösten Endotoxinen gingen aber die Tiere sehr schnell ein.

Nr.	Ge- wicht in grm	Vorbehandlung	Datum der Schutz- impfung	Datum der Infektion	Zeitraum da- zwischen	Virusdosis	Erfolg	Bemerkungen
I	400	2·0 ^{ccm} Cholera- serum VII intraperitoneal	18. XII. 05 10 Uhr 30 Min.	19. XII. 05 10 Uhr 30 Min.	24 Stunden	2 Röhren 18 stünd. Cholera- agarkultur [1 Röhre = 30 ^{mg} oder 15 Ösen] also 30 Ösen	† nach 5 Stunden	Temperatur: 11 Uhr 45 Min. 33·5° C. 2 " 15 " 30·0° " † 4 Uhr 25 Min. Sektionsbefund: Helles seröses Exsudat ohne eitrige Beläge. Im hängenden Tropfen u. gefärbten Präparat nur vor- einzelt Vibrionen sichtbar.
II	550	2·0 ^{ccm} Cholera- serum VI	desgl.	desgl.	"	3 Röhren Cholerakultur oder 45 Ösen à 2 ^{mg}	† nach ca. 18 Stdn.	Temperatur: 11 Uhr 50 Min. 33·5° C. 2 " 33·6° " Sektionsbefund: Starke, ausgedehnte Infiltration an der Injektionsstelle. Keine eitrigen Beläge. Helles Exsudat. Im hängenden Tropfen und gefärbten Prä- parat Vibrionen nicht mehr sichtbar.
III	440	3·0 ^{ccm} Cholera- serum VI	"	"	"	3 Röhren Cholerakultur oder 45 Ösen à 2 ^{mg}	† in der Nacht	Temperatur: 11 Uhr 45 Min. 33·9° C. 2 " 20 " 33·7° " Sektionsbefund: Starke eitrige Beläge auf Leber u. Darm. Peritoneum blutig injiziert. Im gefärbten Präparat keine Vibrionen sichtbar.
IV Kon- trolle	500	2·0 ^{ccm} Normal- serum	"	"	"	2 Röhren Cholerakultur oder 30 Ösen à 2 ^{mg}	† in der Nacht	Temperatur: 11 Uhr 47 Min. 34·3° C. 2 " 33·6° " Sektionsbefund: Keine Infiltration an der Injektionsstelle. Helles Exsudat. Vi- brionen sowohl im hängenden Tropfen, wie im gefärbten Präparat massenhaft sichtbar.

Versuch VIII.

Serumgabe und Infektion gleichzeitig.

Da die gleichzeitige Gabe einer kleinen Serummenge mit der einfachen tödlichen Dosis virulenter 18stündiger Choleraagarkultur zusammenfallen würde mit den von mir schon vorher gemachten Pfeifferschen Versuchen, so wählte ich gleich die 5fache Virusmenge und eine dementsprechende höhere Serumdosis. Alle mit Immuneserum VII behandelten Tiere blieben am Leben, während das Kontrolltier nach gleichzeitiger Injektion von Normalserum starb.

Nr.	Gewicht in grm	Serummenge	Dosis der Cholera- kultur	Erfolg	Bemerkungen
I	300	0.2 cem Serum VII subkut. an der Bauchwand	3 Ösen (5fache töd- liche Dosis) Cholera- kultur in 1 ^{cem} Bouillon intrapitoneal	bleibt am Leben	Tier ist nach 17 Stunden wieder sehr munter und zeigt Temperatur 39.1° C.
II	400	0.1 cem Serum VII subkut. an der Bauchwand	desgl.	desgl.	Nach 17 Stunden wieder sehr munter, Temperatur um diese Zeit 38.7° C.
III	340	0.2 cem Serum VIII intrapitoneal	"	"	Nach 17 Stunden ganz normal, Temperatur 37.9° C.
IV	280	0.5 cem Normalserum intrapitoneal	"	† nach ca. 20 Stdn.	Nach 15 Stunden Temperatur 34.0° C. Tier sehr krank. Sektion konnte aus äußeren Gründen nicht gemacht werden.

E. Heilversuche mit Choleranukleoproteid-Serum.

Versuch IX.

Drei Tiere erhalten die ca. 3 fache tödliche Dosis virulenter Choleaagarkultur intraperitoneal und nach 1 Stunde verschiedene Dosen Serum VII subkutan. Vor der Seruminjektion wird jedem Tier mit einer sterilen Kapillare Peritonealfüssigkeit entnommen und auf das Vorhandensein von beweglichen Vibrionen geprüft.

Nr.	Ge- wicht in grm	Tempe- ratur Grad C	Zeit	Virusmenge	Serummenge nach 1 Stunde	Befund der nach 1 Stunde entnommenen Peritoneal- flüssigkeit	Erfolg	Bemerkungen
I	300	38.2	8 Uhr 45 Min. morgens	3 Ösen 18stündiger Cholera- agarkultur (3—4 fache tödliche Dosis)	0.3 cem Serum VII subkutan	Zahlreiche Vibrionen in lebhafter Bewegung	bleibt am Leben	Temp. nach 30 Min. 37.6° C.
								" " 45 " " " 38.1° "
								" " 1 Std. 30 Min. 36.5° "
								" " 5 " " " " 36.9° "
								" " 9 " " " " 38.1° "
								" " 24 " " " " 37.0° "
								" " 32 " " " " 37.8° C., Tier normal.
II	400	38.0	9 Uhr morgens	desgl.	0.2 cem Serum VII subkutan	desgl.	desgl.	Temp. nach 30 Min. 38.0° C.
								" " 45 " " " 37.5° "
								" " 1 Std. 30 Min. 37.5° "
								" " 5 " " " " { unter 38.6° mit den
								" " 7 " " " " { mir zur Verfügung
III	300	38.0	9 Uhr 10 Min. vorm.	"	0.1 cem Serum VII subkutan	"	"	" " 30 " " " " { stehend. Thermomet.
								" " 30 " " " " { nicht zu bestimmen.
								" " 38.1° C., Tier normal.
								Temp. nach 45 Min. 37.5° C.
								" " 1 Std. 30 Min. 37.0° "
								" " 4 " " " " 36.4° "
								(Tier krank, apathisch.)
								" " 6 " " " " 35.1° C. desgl.
								" " 30 " " " " 37.9° C., Tier normal.

Versuch X.

Drei Meerschweinchen erhalten je 2 Ösen der 18 stündigen Cholerakultur. Nach 1 Stunde 30 Minuten erfolgt eine Einspritzung von je 1^{cem} Choleraserum. Obwohl die Temperatur nach dieser Zeit schon bedeutend gefallen war und die Peritonealflüssigkeit von Vibrionen wimmelte, konnten sämtliche Tiere durch die gegebenen Serumdosen geheilt werden.

Nr.	Ge- wicht in grm	Tempe- ratur Grad C	Zeit	Virusmenge	Serummenge nach 1½ Stunden	Befund der Peritoneal- flüssigkeit nach 1½ Std.	Erfolg	Bemerkungen
I	320	38.2	4 Uhr nachm.	2 Ösen Cholera- kultur (3 fache töd- liche Dosis)	1.0 cem Serum II intraperitoneal	Zahlreiche bewegliche Vibrionen	bleibt am Leben	Temp. 4 Uhr 15 Min. = 35.9°C } " 4 " 57 " = 35.7 " } 4. XII. 05. " 5 " 20 " = 35.2 " } " 2 " 30 " = 38.1 " } 5. XII. 05.
II	350	37.9	4 Uhr 5 Min. nachm.	desgl.	1.0 cem Serum IX intraperitoneal	desgl.	desgl.	Temp. 4 Uhr 20 Min. = 36.3°C } " 4 " 58 " = 35.9 " } 4. XII. 05. " 5 " 30 " = 35.6 " } " 2 " 35 " = 38.6 " } 5. XII. 05.
III	310	38.0	4 Uhr 10 Min. nachm.	"	1.0 cem Serum VI intraperitoneal	"	"	Temp. 4 Uhr 25 Min. = 36.0°C } " 5 " 00 " = 34.9 " } 4. XII. 05. " 2 " 40 " = 39.0 " } 5. XII. 05.

Versuch XI.

Zwei Tiere erhalten 2 Ösen 18 stündiger Choleraagarkultur (3fache tödliche Dosis) und nach 2 Stunden Choleraserum. Ein Tier kommt durch, während das zweite nach 40 Stunden an Intoxikation stirbt. Kontrolltier, welches nach 2 Stunden 1 cem Normalserum erhält, stirbt nach 24 Stunden an Allgemeinfektion. Während bei einem Tier eine Heilung erzielt werden konnte, wurde bei dem anderen der letale Ausgang um 12 Stunden hinausgeschoben.

Nr.	Ge- wicht in grm	Tempe- ratur Grad C	Zeit	Virusmenge	Serummenge	Befund der Peritoneal- flüssigkeit nach 2 Std.	Erfolg	Bemerkungen
I	400	38.2	5. XII. 05 3 Uhr nachm.	2 Ösen Cholerakultur	1.0 cem Serum XIX intra- peritoneal	Zahlreiche bewegliche Vibrionen	bleibt am Leben	Temper. 4 Uhr 20 Min. = 37.9° C " 4 " 55 " = 37.6° " } " 5 " 15 " = 37.6° " } 5. XII. 05. " 5 " 35 " = 37.0° " } " 8 " 20 " = 38.2° " } 6. XII. 05.
II	300	37.9	5. XII. 05 3 Uhr 10 Minuten nachm.	desgl.	0.5 cem Serum XIX intra- peritoneal	desgl.	† nach 40 Stunden durch Intoxi- kation	Temper. 4 Uhr 25 Min. = 37.5° C " 4 " 50 " = 38.1° " } " 5 " 17 " = 36.2° " } 5. XII. 05. " 5 " 45 " = 35.8° " } " 8 " 25 " = 35.5° " } " 3 " — " = 35.0° " } 6. XII. 05. † am 7. XII. morgens. Sektion: Keine Vibrionen.
III	380	37.8	5. XII. 05 3 Uhr 15 Minuten nachm.	"	1.0 cem Normalserum intra- peritoneal	"	† nach 24 Stunden	Temper. 4 Uhr 30 Min. = 35.9° C " 5 " — " = 35.1° " } " 5 " 20 " = 35.0° " } 5. XII. 05. " 5 " 50 " = 35.0° " } " 8 " 30 " = 33.7° " } " 2 " 30 " = 30.0° " } 6. XII. 05. † 3 Uhr vorm. 6. XII. 05. Sektion: allgemeine Cholerainfektion.

Versuch XII.

Zwei Tiere erhalten 4 Stunden nach der Infektion mit 3 Ösen Cholerakultur größere Serumengen intra-peritoneal. Tier I bleibt am Leben, während Tier II nach 52 Stunden stirbt. Hier wurde der letale Ausgang be-deutend hinausgeschoben und ist jedenfalls durch Mischinfektion veranlaßt worden.

Ge- Nr. in grm		Tempe- ratur Grad C	Zeit	Virusmenge	Serummenge nach 4 Stunden	Befund der Peritoneal- flüssigkeit nach 4 Stdn.	Erfolg	Bemerkungen
I	320	37.6	6. XII. 05 10 Uhr 45 Minuten	3 Ösen Cholerakultur intra- peritoneal	1.5 cem Serum VII intra- peritoneal	Zahlreiche Vibrionen in lebhafter Bewegung	bleibt am Leben	Um 2 Uhr 45 Min., also nach 4 Stunden Tempe- ratur 33.7° C, Tier sehr krank u. völlig apatisch. Am 7. XII. 05 Tier noch am Leben. aber sehr krank. Temperatur 33.8° C. Am 8. XII. 05 Tier merklich besser, Temp. 35.5° C. " 9. XII. 05 Tier normal, Temp. 37.9°.
II	500	38.0	6. XII. 05 10 Uhr 50 Minuten	3 Ösen Cholerakultur intra- peritoneal	1.25 cem Serum VII intra- peritoneal	desgl.	+ am 8. XII. nachm. 3 Uhr	Nach 4 Stunden Temp. 34.2° C. Am 7. XII. 05 3 Uhr Temp. 33.8° C, Tier sehr krank. Am 8. XII. 05 + nachm. 3 Uhr. Sektionsbefund: An der Injektionsstelle eitrige Entzündung, Peritoneum stark injiziert. Nieren- becken eitrig, Peritonitis. Im fadenziehenden Peritonealexsudat keine Vibrionen sichtbar, viel Leukozyten. Herz, Lunge normal. Im gefärbten Präparat keine Bakterien sichtbar. Strichkultur: Kolonien von Streptokokken und nach Gram negativ färbbaren Stäbchen, die der Kolligruppe angehören. Bouillonkultur: Gleicher Befund.

Versuch XIII.

Drei Tiere erhalten je $\frac{2}{3}$ 18 stündige Choleraagarkultur [ca. 20 fache tödliche Dosis] in 1^{cem} Bouillon aufgeschwemmt. [1 Agarkultur = 30 mg = 15 Normalösen à 2 mg.] 2 Agarkulturen wurden mit 3^{cem} Bouillon abgeschwemmt und jedem Tier 1^{cem}, enthaltend 10 Normalösen, intraperitoneal eingespritzt. Nach 6 Stunden erhalten zwei Tiere je 2^{cem} Choleraserum VII. Kontrolltier bekommt die gleiche Dosis Normalserum. Alle drei Tiere sterben im Laufe der Nacht.

Nr.	Ge- wicht in grm	Tempe- ratur Grad C	Zeit	Virusmenge	Serummenge nach 6 Stunden	Befund der Peritoneal- flüssigkeit nach 6 Stdn.	Erfolg	Bemerkungen
I	350	37.9	12. XII. 05 9 Uhr 30 Minuten	$\frac{2}{3}$ Cholera- agarkultur oder 10 Normalösen [ca. 20 fache tödl. Dosis]	2 ^{cem} Cholera- serum VII	Sehr viel lebhaft bewegliche Vibrionen	† in der Nacht vom 12. zum 13.	Temperatur um 3 Uhr, also $5\frac{1}{2}$ Stunden nach der Infektion: unter 33.5° C. Sektion: Infiltration an der Injektionsstelle. Helles seröses Peritonealexsudat. Im hängenden Tropfen geringe Bewegung sichtbar. Gefärbtes Präparat zeigt vereinzelt intakte Vibrionen.
II	320	37.8	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	Temperatur um 2 Uhr 45 Min. = unter 33.5° C. Sektion: Peritoneum normal, sehr wenig Exsudat. Im hängenden Tropfen keine Vibrionen in Be- wegung, im gefärbten Präparat sehr vereinzelt Vibrionen sichtbar.
III	370	38.1	"	"	2 ^{cem} Normalserum	"	"	Temperatur: 2 Uhr 30 Min. = 33.8° C. Sektion: Viel helles Exsudat, keine eitrigen Be- lage, Inguinaldrüsen geschwollen und stark in- filtriert. Mikroskopisch lebhaft bewegliche Vi- brionen sichtbar.

Versuch XIV.

Drei Tiere bekommen je 1 Öse 18 stündiger Choleraagarkultur [ca 1- bis $1\frac{1}{2}$ fache tödl. Dosis] und nach eingetretenen Krankheitssymptomen und starkem Temperaturabfall $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ cem Choleraserum als Heilserum. Das Kontrolltier erhält kein Serum und stirbt nach 25 Stunden an allgemeiner Cholerainfektion, während die mit Choleraserum behandelten Tiere am Leben bleiben.

Nr.	Ge- wicht in grm	Tempe- ratur Grad C	Zeit	Virusmenge	Serummenge	Befund des Peritoneal- exsudats vorSerumgabe	Erfolg	Bemerkungen
I	300	37.0	19. XII. 05 11 Uhr 30 Minuten	1 Öse Cholera- kultur intra- peritoneal	5 Uhr 30 Min. $\frac{1}{2}$ cem Ch.-Serum VII subkutan	Im Exsudat 6 Stunden nach Infektion d. Peritoneum entnommen, zahlr. bewegl. Vibrien	bleibt am Leben	Temper. 2 Uhr 32 Min. = 37.2° C " 3 " 35 " = 36.8° " " 4 " 8 " = 36.1° " " 5 " 2 " = 35.6° " " 2 " nachm. = 38.3° " Tier normal.
II	350	36.8	desgl.	desgl.	5 Uhr $\frac{1}{2}$ cem Serum VII intra- peritoneal	Im Exsudat nach 5 Stdn. lebhaft bewegliche Vibrien	desgl.	Temper. 2 Uhr 36 Min. = 38.7° C " 3 " 50 " = 38.3° " " 4 " 15 " = 38.1° " " 5 " — " = 37.0° " " 3 " 15 " = 37.8° " 20. XII. 05.
III	360	37.0	"	"	5 Uhr 15 Min. $\frac{1}{4}$ cem Serum VII subkutan	desgl.	"	Temper. 2 Uhr 41 Min. = 37.2° C " 3 " 58 " = 35.6° " " 4 " 40 " = 35.0° " " 2 " — " = 37.7° " 20. XII. 05.
IV	360	36.9	"	"	kein Serum	"	† am 20. XII. ca. 1 Uhr 30 Minuten	Temper. 2 Uhr 45 Min. = 37.0° C " 3 " 58 " = 35.0° " † am 20. XII. 05 mittags.

Resultate.

I.

1. Die Cholera-vibrionen werden von 1 prozentiger Kalilauge in sehr kurzer Zeit vollständig aufgelöst. Durch Ansäuerung mit Essigsäure wird aus der alkalischen Lösung ein den Nukleoproteiden verwandter Körper gefällt, der, Tieren eingepfht, die Bildung von Immunkörpern veranlaßt. Diese immunisierende Wirkung ist nicht bedingt durch die Gegenwart abgetöteter, im übrigen aber intakter Cholera-vibrionen, sondern wird lediglich erreicht durch die aufgelöste Leibessubstanz bzw. die daraus gewonnenen, chemisch als Nukleoprotein charakterisierten Körper.

2. Dosen von 0.01 bis 0.1 g^{cm} Choleranukleoprotein (Trockensubstanz) werden von Kaninchen fast reaktionslos vertragen und erzeugen schon bei einmaliger subkutaner Applikation Choleraimmunkörper im Blutserum der eingepfhten Tiere.

3. Das Blutserum der Immuntiere besitzt sehr reichlich Cholera-agglutinine.

4. Das Serum der mit Choleranukleoprotein behandelten Tiere ist instande, in vitro die Keimzahl einer Cholera-vibrionenemulsion bedeutend zu vermindern (bakterizide Wirkung in vitro).

5. Untersuchte man das Serum nach den Angaben Pfeiffers im Meerschweinchen-Peritoneum, so ergab sich nach einmaliger Injektion:

ein Maximaltitel von 0.005,

nach mehrmaliger Injektion:

(im ganzen 0.53 g^{cm} Vaccin) ein Maximaltitel von 0.0008,

(im ganzen 0.255 g^{cm} Vaccin) ein Minimaltitel von 0.009.

6. Aus den Resultaten 3 bis 5 folgt, daß sich das Choleranukleoprotein sehr wohl zur aktiven Schutzimpfung gegen Cholera verwenden läßt.

II.

7. Das Serum der mit Choleranukleoprotein behandelten Tiere verleiht je nach seinem bakteriziden Titer in Dosen von 0.001 bis 1.5 ccm Meerschweinchen einen hohen Grad von Immunität gegen nachfolgende Infektion mit Multiplen der tödlichen Dosis. Es vertragen die so immunisierten Tiere 3 Ösen pro 100 g^{cm} Tiergewicht, also die 15fache tödliche Dosis, fast reaktionslos.

8. Injiziert man Versuchstieren größere Dosen des Serums (2.0 bis 3.0 ccm pro Tier) und überschwemmt sie intraperitoneal mit großen Mengen Cholera-vibrionen (30 bis 45 Normalösen pro Tier), so gehen die Tiere zwar zugrunde, der Sektionsbefund aber ergibt im Gegensatz zu den Kontrolltieren das typische Bild des bekannten „sterilen Choleratodes“.

9. Erfolgt die Seruminjektion postinfektionell, 1 bis 4 Stunden nach der Infektion und enthält das Peritonealexsudat lebende Vibrionen, so gelingt es dennoch, in gewissen Grenzen schwer erkrankte Tiere, die Temperaturerniedrigungen unter 34° zeigten, am Leben zu erhalten. Das Serum entfaltet also auch kurative Wirkungen.

10. Aus den Resultaten 7, 8 und 9 ergibt sich also, daß das Cholera-nukleoproteid-Immunserum sich experimentell sowohl zur passiven Immunisierung wie zur therapeutischen Verwendung eignet.

Literatur-Verzeichnis.

Aschoff, Ehrlichs Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstl. Immunisierungsprozesse. *Zeitschrift für allgem. Physiologie*. 1902. Bd. I. Heft 2.
 Baag Ivar, Über Nukleoproteide und Nukleinsäuren. *Deutsche med. Wochenschrift*. 1901. Jahrg. XXVII.

Behring, E., u. Ransom, Choleragift und Choleraantitoxin. *Ebenda*. 1895. Nr. 29. S. 457.

Bendix, Zur Chemie der Bakterien. *Ebenda*. 1901. Jahrg. XXVII.

Bertarelli, E., Über die aktive Immunisierung des Menschen gegen Cholera vermittelt autolytischer Produkte des cholagenen Vibrio und über das Wesen dieser autolytischen Produkte. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1905. Bd. XXXVIII. Abt. I.

Besredka, A., De l'immunisation active contre la peste, le choléra et l'infection typhique. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1902. T. XVI. p. 918.

Brieger u. Wassermann, Über künstliche Schutzimpfung von Tieren gegen Cholera asiatica. *Deutsche med. Wochenschrift*. 1892. Bd. XXXI. S. 701.

Bordet, Über die Absorption der Alexine durch Bakterien, die sich mit Zwischenkörpern verbunden haben. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1901. T. XV. p. 289.

Derselbe, Pfeiffersches Phänomen außerhalb der Bauchhöhle. *Ebenda*. 1895. T. IX. p. 433.

Defalle, Recherches sur le rôle de l'enveloppe des Microbes dans l'agglutination. *Ebenda*. 1902. T. XVI.

Deutsch u. Feistmantel, *Die Impfstoffe und Sera*. Leipzig 1903.

Dieudonné, *Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie*. Leipzig 1903.

von Dungern, Ist die Virulenz der Cholera Bazillen abhängig von ihrer Giftigkeit? *Diese Zeitschrift*. 1895. Bd. XX.

Emmerich, R., u. A. Korscher, Die bakteriolytische Wirkung der Nukleasen und Nukleasen-Immunproteidine als Ursache der natürlichen und künstlichen Immunität. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1902. Bd. XXXI.

Galeotti, Ricerche sull'immunizzazione delle cavie contro la peritonite colerica. *Lo sperimentale*. 1896.

Derselbe, Sulle proprietà preventive e curative dei nucleoproteidi degli organi di animali immunizzati. *Ebenda*. 1899. Nr. 2.

Derselbe, Beitrag zur Kenntnis der bakteriellen Nukleoproteide. *Zeitschrift f. physiol. Chemie*. 1898. Bd. XXV.

Galeotti u. Maleuchini, Experimentelle Untersuchungen bei Affen über die Schutzimpfung und Serumtherapie gegen Beulenpest. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1897. Abt. I. Bd. XXII. S. 508.

Gruber u. Durham, Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Cholera vibrio u. Typhusbazillus (Agglutinine). *Münchener med. Wochenschrift*. 1896. Nr. 13.

Hammarsten, Zur Kenntnis der Nukleoproteide. *Zeitschr. für physiol. Chemie*. 1894. Bd. XIX.

Issaëff, Untersuchungen über die künstliche Immunität gegen Cholera. *Diese Zeitschrift*. 1894. Bd. XVI. S. 287.

Kolle, Beiträge zu den experimentellen Cholerastudien. *Ebenda*. 1894. Bd. XVI. S. 356.

Derselbe, Zur aktiven Immunisierung des Menschen gegen Cholera. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1896. Bd. XIX. S. 97.

Derselbe, Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Cholera asiatica. *Deutsche med. Wochenschrift*. 1897. Nr. 1. S. 4.

Lustig u. Galeotti, Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Tieren. *Ebenda*. 1897. Nr. 15 u. 19.

Dieselben, Intorno l'azione del nucleoproteide estratto dai bacilli della peste bubbonica, sul sistema circolatoria. *Lo sperimentale*. 1898.

Lubomondrov, Action des injections salines. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1905. Bd. XIX. S. 572.

Lustig, Intorno alle vaccinazioni preventive contro la peste bubbonica. *La clinica moderna*. 1901. Nr. 49.

Pfeiffer, Untersuchungen über das Choleragift. *Diese Zeitschrift*. 1892. Bd. XI. S. 393.

Derselbe, Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität u. über spezifisch bakterizide Prozesse. *Ebenda*. Bd. XVIII.

Derselbe, Die Differentialdiagnose der Vibrionen der Cholera asiatica mittels der Immunisierung. *Ebenda*. Bd. XIX. S. 75.

Derselbe, Ein neues Grundgesetz der Immunität. *Deutsche med. Wochenschr*. 1896. Nr. 7 u. 8.

Pfeiffer u. Issaëff, Über die spezifische Bedeutung der Choleraimmunität. *Diese Zeitschrift*. Bd. XVII. S. 355.

Dieselben, Experimentelle Untersuchungen mit Choleravibrionen an Kaninchen. *Ebenda*. Bd. XVIII.

Pfeiffer u. Marx, Über Schutzimpfungen gegen Cholera u. Typhus mit konserviertem Impfstoff. *Deutsche med. Wochenschrift*. 1898.

Pfeiffer und Wassermann, Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität. *Diese Zeitschrift*. 1893. Bd. XIV. S. 46.

De Piassetzka, Recherches sur la Polyvalence du Serum antistreptococcique. *Thèse inaugurale de la Faculté de Médecine de Berne*. 1903.

Römer, *Die Ehrlichsche Seitenkettentheorie und ihre Bedeutung für die medizinischen Wissenschaften*. Wien 1904.

Sachs, *Die Hämolyse und ihre Bedeutung für die Immunitätslehre*. Wiesbaden 1902.

Strong, Richard, *Protective Inoculation Against asiatic Cholera*. (An Experimental Study.) Manila, Bureau of Public Printing, 1904.

Tavel, Krumbein u. Glücksmann, Über Pestschutzmaßregeln. *Diese Zeitschrift*. 1902. Bd. XL.

Tiberti, Über die immunisierende Wirkung des aus dem Milzbrandbazillus extrahierten Nukleoproteides. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1904. Bd. XXXVII.

Voges, Die Choleraimmunität. *Ebenda*. 1896.

Derselbe, Über die intraperitoneale Cholerainfektion der Meerschweinchen. *Diese Zeitschrift*. Bd. XVII.