Estudos sobre imunidade na peste

pelo

DR. ARTHUR MOSES

Assistente.

Studien ueber Immunitaet bei der Pest

von

DR. ARTHUR MOSES

Assistenten am Institute.

Encarregados do preparo do soro antipestoso no instituto, ocorreu-nos verificar uma questão, que ha muito se debate, qual a da secreção de toxina por parte do bacilo da peste.

Em balões de FERNBACH, com caldo simples lixeiramente álcalino ou neutro semelhantes de bacilo da peste cuja virulencia se mantem em inoculações quinzenais em cobaia ou rato e mantivemos durante 30 a 45 dias em temperatura ambiente ou na estufa a 35 ou 37 grãos. Em prazos diversos 1, 3, 8, 14, 20, 30 e 45 dias filtrámos em papel CHAR-DIN e em velas BERKEFELD e CHAMBER-LAND F, pequenas quantidades da cultura e inoculámos por via venosa em rato. Quando filtradas em papel, os animais inoculados morriam em prazo variável, revelando a necrose bacilo da peste no ponto inoculado; quando em vela, não só resistiam os animais, mas ainda, não se mostravam imunes a posterior inoculação de germe vivo. MARKL, (1898) en-

Der Umstand, dass ich im hiesigen Institute mit der Herstellung des Pestserums beauftragt bin, veranlasste mich zum Studium einer viel debattierte Frage, nämlicher der Sekretion von Toxinen durch den Pestbazillus.

Ich nahm FERNBACHsche Ballons mit einfacher neutraler oder schwach alkalischer Bouillon und impfte sie mit Pestbazillen, deren Virulenz durch zweistündliche Passagen durch Meerschweinchen oder Ratten unterhalten wird; die Kulturen blieben 30-45 Tage bei Zimmertemperatur oder in einem Bruetschrank von 35-37°. Jeweilen nach 1, 3, 8, 14, 20 30 und 45 Tagen wurden kleine Quantitäten der Kultur durch CHARDINsche Papierfilter oder Filterkerzen (BERKEFELD und CHAMBERLAND F) filtriert und Ratten intravenös injiziert. Bei Papierfiltration starben die geimpften Tiere nach wechselnder Frist und zeigten bei der Sektion am Orte der Impfung Pestbazillen; bei Anwendung
tretanto, consegue matar ratos, em 24 horas, com 0,05 cc. de filtrado de cultura de quatro semanas e em 48 horas, com 0,005 cc. de cultura de 48 horas. Aquecido a 70 graus, perde o filtrado a toxidez para camomondongo, mantendo-a para rato, coelha e cão. A produção de antitoxina em animais inoculados com toxina aquecida fez o autor acreditar na existência de 2 toxinas no filtrado.

Em outro ensaio, inoculamos em rato de peso aproximado de 100 gr. filtrado em vel. CHAMBERLAND de culturas de um mez, em meio preparado, adicionando a 500 cc. de caldo neutro ou alcalino 150 de soro de cavallo, aquecido a 56 graus, mantendo um dos balões de FERNBACH no armário do laboratório e outro em estufa a 37 graus. Dos ratos inoculados, morreu um em 2 dias com forte edema hemorrágico no ponto de inoculação.

A ausência de germes no edema fez-nos pensar em ação específica do filtrado, hipotese esta afastada após inoculação de doses decrecentes, desde 2cc. até 0,1 cc. do mesmo material em nova série de ratos, que se mantiveram todos vivos.

De posse destes resultados, somente outros balões de FERNBACH, contendo caldo neutro e quantidades variáveis de carbonato de sodio cristalizado, 1—2—3—4 grs. por litro. O conteúdo de cada um destes balões filtrado após vinte dias, um mez ou quarenta dias de permanência em temperatura ambiente e inoculado cerca de 1 cc. em ratos de 100 grs de peso, por via subcutanea, mostrou-nos que, ainda desta vez, não tínhamos conseguido toxina pestosa livre no caldo.

Em outra série, adicionamos ao caldo neutro doses crescentes de sulfato de sodio, desde 1 até 10 grs. por litro, mantendo os balões em temperatura ambiente e na estufa a 37 graus. Ainda desta vez, as inoculações em ratos foram por via subcutanea. Dos inoculados com o filtrado de cultura, contendo 6 a 8 grs por litro, morreram alguns, 3 a 5 dias depois, sem que da necrose se pudesse tirar conclusao. Repetidas inoculações com doses decrecentes deste material provaram-nos não existirem de Kerzen blieben die Tiere nicht nur am Leben, sondern zeigten auch gegen eine spätere Impfung mit lebenden Bazillen keine Immunität. Dagegen konnte MARKL [1898] Ratten binnen 24 Stunden mit 0,05 Kzm. und binnen 48 Stunden mit 0,005 Kzm. Filtrat einer vier Wochen alten Kultur toeten. Auf 70° erhielt verlor das Filtrat die Giftigkeit fuer Mäuse, wahrend eine solche fuer Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen fortbestand. Die Bildung von Antitoxin bei den mit Toxin geimpften Tieren liess den Autor die Existenz zweier Toxine im Filtrat annehmen.

Bei einem anderen Versuche impfte ich eine za. 100 Gramm schwere Ratte mit durch CHAMBERLANDsche Kerzen filtrierten, einen Monat alten Kulturen; das Nahrungsmittel bestand aus 500 Kzm. neutraler oder leicht alkalischer Bouillon mit 150 Pferdserum, wobei ein Ballon im Laboratoriumsschrank, ein anderer bei 37° aufbewahrt wurde. Von den geimpften Ratten starb eine nach zwei Tagen mit starkem haemorrhagischem Oedem der Impfstelle. Das Fehlen von Keimen an der Impfstelle liess mich an eine spezifische Wirkung des Filtrates glauben; indessen wurde diese Annahme durch eine neue Versuchsreihe widerlegt, bei welcher absteigende Dosen von 2,0—0,1 Kzm. auf Ratten ueberragen wurden, welche alle am Leben blieben.

Im Besitze dieser Resultate impfte ich neue Ballons, welche neutrale Bouillon mit wechselnden Mengen krystallisierten Nitri umkarbonates (1,2,3 und 4 Gramm pro Liter) enthielt. Nach einem Wachstum von 20,30 oder 40 Tagen bei Zimmertemperatur wurde der Inhalt dieser Ballons filtrirt; eine subcutane Verimpfung von je 1 Kzm. auf Ratten von 100 Gramm Gewicht, zeigte mir dass auch dieses Mal die Bouillon kein freies Toxin enthielt.

Bei einer weiteren Serie setzte ich zu der neutralen Bouillon steigende Dosen von Nitrium sulfat (1,0—10,0 gr. pro Liter) und liess die Ballons bei Zimmertemperatur und im Brütschrank bei 37° stehen. Auch diesmal war die Verimpfung subkutan. Von den Tieren,
tir no filtrado toxina, que com regularidade matasse ratos ou camandongos.

Nem outro foi o resultado obtido, inoculando filtrado de cultura de 40 dias em temperatura ambiente, em caldo neutro, contendo 10 grs. de glicose e 1-2-4-6-8-10 e 20 grs. de sulfato de sodio por litro. Ainda desta vez, com o filtrado dos balões contendo 6, 8 e 26 grs. de sulfato morreram poucos dos ratos inoculados, sem que de posteriores experiências pudéssemos concluir que existisse em alguns das culturas toxina pestosa, matando, com regularidade, animais sensíveis.

Depois de procurar, com resultado negativo, obter toxina em cultura em caldo soro, contendo 4 e 8 grs. de sulfato de sodio por litro, em caldo neutro com 50 grs. de glicose por litro e 5 a 10 grs. de sulfato de sodio, em caldo soro com 5 grs. de glicose e, finalmente, em caldo soro com 1 a 3 grs. de carbonato de sodio cristalisado por litro, usando sempre manter a cultura em balão de FERNBACH, durante um meiz em temperatura ambiente, passámos a estudar a possibilidade de conseguir uma endotoxina de atividade bastante para dela se poder tirar vantagem no preparo de um soror. Quer toxina livre, quer endotoxina poderiam explicar a forte prostração e propensão para hemorragias, que se rejeitam na peste. Das endotoxinas obtidas por pesquisadores diversos, algumas se extraem do bacilo em quantidade diminuta e para elas não se tem conseguido formação de anticorpo com poder neutralisante, ao passo que outras se obtêm em quantidade maior e para elas se tem conseguido imunisoro. BESREDKA extrae de culturas em gelatina emulsionadas em solução fisiológica aquecida a 60 graus, durante uma hora, uma endotoxina solúvel para o qual produz antiendotoxina. BESREDKA recomenda ainda secar no vacuo a emulsão e depois tratar 0,15 grs de germe por 2 cc. de solução fisiológica e 8 cc. de soro. Após uma e meia a duas horas de permanência em temperatura de laboratório centrífuga-se e no líquido se encontra endotoxina capaz de produzir antiendotoxina. LUS TIG e GALLEOTI (1897) empregam solução die 6,0-8,0 enthaltendes Kulturfiltrat erhie Linden, starben einige 3-5 Tage spater, ohne dass die Autopsie zu einem Schluss fuehrte. Wiederholte Uebertragung dieses Materiales in absteigenden Dosen uberzeugte mich, dass das Filtrat kein Toxin enthalt, welches Ratten oder Mäuse regelmässig toetet.

Nicht anders war das Resultat beim verimpfen filtrirter Kulturen, die 40 Tage bei Zimmertemperatur gestanden hatten und auf einen Liter neutrale Bouillon mit 10 Gramm Glykose 1,2,4,6,8,10 und 20 Gramm Natrium sulfate enthielten. Auch dieses Mal starb nur ein geringer Teil der mit den 6,8 und 20 Gramm Natriumsulfat enthaltenden Filtraten geimpften Ratten, ohne dass spättere Versuche gestattet haetten, anzunehmen, dass in den Kulturen ein fuer empfindliche Tiere regelmaessig toedliches Toxin existiere. Nachdem ich umsonst versucht hatte, Toxin zu erhalten, indem ich Serumbouillon mit 0,4 und 0,8% Natriumsulfat, neutrale Bouillon mit 5% Glykose und 0,5-1% Natriumsulfat, Serum bouillon mit 0,5% Glykose und zu- letzterebouillon mit 0,1-0,2% 00 kristallisierten Natriumcarbonates gebrauchte und die Ballonkulturen einen Monat lang bei Zimmer temperature hielten, untersuchte ich, ob es moglich ware, ein genuegend aktives Endotoxin zu gewinnen, um dasselbe bei der Herstellung eines Serums mit Erfolg zu gebrauchen. Die starke Prostration und Neigung zu Haemorrhagien, welche bei der Pest beobachtet wird, ies sich ebensowohl durch ein Endotoxin, als durch ein freies Toxin erklaren. Von den durch verschiedene Unter- sucher gewonnenen Endotoxinen, konnten einige nur in geringen Quantitaeten den Bazillen entzogen werden und es wurde fuer dieselben kein Antikörper mit neutralisiren- der Wirkung erzielt, wahrend fuer andere, welche in grosserer Menge erhaeltlich sind, ein Immunserum gewonnen wurde. Aus Ge- latinekulturen, die in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und eine Stunde lang auf 60° erhitzt wurden, extrahierte BESRED- KA ein loesliches Endotoxin, fuer welches er ein Antieltoxin herstellte. Er empfiehlt
de potassa a 0,75% até 1% para extrair de uma cultura de 24 horas sobre a qual atua durante 12 a 24 horas e tratamento posterior pelo ácido acetico do filtrado em papel, uma nucleoproteína com capacidade imunizante para o homem na dose de 2 a 3 mg. e de 1,1 para cada 100 grs. de ratos. A mais importante propriedade das nucleoproteínas no ponto de vista biológico e prático é, justamente a capacidade, que têm de funcionar como substância imunizante ativa. ROWLAND (1911), da comissão inglesa para estudo da peste na Índia, propôs para extrair do bacilo da peste uma nucleoproteína com propriedade de antijeno a seguinte técnica—: Culturas de quatro dias em temperatura de 30 graus são mortas pelo cloroforrinio e dos germes mortos se extrai com solução fisiológica uma substância de pouco valor tóxico e nenhum valor imunizante e com sulfato de sodio, outra, B, bastante tóxica, que, inoculada em ratos em dose submortal imuniza-os contra posterior inoculação de germe vivo. As propriedades químicas das 2 substâncias muito se aproximam. Posteriormente ROWLAND destruiu os germes pelo calor, colocando o frasco de cultura na estufa a 60 graus por espaço de uma hora. A relação entre a nucleoproteína obtida e a quantidade de germes na cultura, feitas as verificações por pesada, é de 1:10. Mais ativa que o produto de LUSTIG e GALLEOTTI e de mais facil preparo imuniza 60% dos ratos com a inoculação de 0,001 mg. Quando guardada, perde rapidamente a tóxidez. Mais tarde, recomendou como mais constante produto o que denomina TRK e que não é mais que uma mistura de bacilos mortos e sulfato de sodio, preparada na temperatura de 30 graus e rapidamente solidificada em cuba com gelo e conservada em fragmentos, em vidro com rolha de esmeril. Na ocasião de se usar dissolve-se um fragmento em solução salina a 0,85% na temperatura de 36 graus, resfria-se até O grao, para então filtrar.

O aquecimento a 53 ou 60 graus pelo espaço de meia hora reduz a toxidez, respetivamente, a um quarto ou a um nono.

auch, die Emulsion im Vacuum zu trocknen
und auf 0,15 Bakteriensubstanz 2,0 physiologische Losung und 8,0 Serum einwirken zu lassen. Nach 1 1/2—2stuendiger Einwirkung
bei Laboratoriumstemperatur findet man in
der Fluessigkeit ein Endotoxin, mit dem man
ein Antiendotoxin gewinnen kann. LUSTIG
und GALEOTTI (1897) gebrauchten eine
0,75 – 1% ige Kaliloesung, welche 12 – 24
Stunden auf eine 24stundige Kultur einwirk-
te, dann durch Papier filtriert und mit Essig-
saure behandelt wurde, um ein Nukleopro-
tein zu extrahiren, welches beim Menschen
in der Dose von 2 – 3 Mg., bei der Ratte in
derjenigen von 1,1, fuer je 100 Gramm Ge-
wicht, immunisierend wirkte. Die biologisch
und praktisch wichtigste Eigenschaft der
Nukleproteine ist gerade ihre Fachigkeit als
aktiv immunisierende Substanz zu funktionie-
en. ROWLAND, ein Mitglied der englischen
Komission fuer das Studium der Pest in
Indien, proponierte 1911 die nachfolgende
Technik, um aus den Pestbazillen das Nu-
kleoprotein mit Antigeneigenschaften zu ge-
winnen: Kulturen, welche vier Tage bei
30° gewachsen waren, werden mit Chloro-
form getoetet; aus den toten Bazillen ent-
zieht man mit physiologischer Losung einen
wenig toxische und gar nicht immunisieren-
de Substanz (A) und mit Natriumsulfat eine
andere (B), welche ziemlich toxisch ist und
Ratten, die eine, nicht ganz toedliche Dose
erhalten hatten gegen eine spaeter Anwen-
dung lebender Bazillen schuetze. Spaeter
toetete ROWLAND die Keime durch Hitze,
indem er die Kulturflaschen fuer eine Stunde
in einem Brutschrank bei 60° hielt. Das
Verhaeltnis zwischen dem erhalteten Nu-
kleoprotein und der Bakterienmasse in der
Kultur wurde durch Waegung auf 1:10 be-
stimmt. Das Produkt ist wirksamer und leich-
ter herzustellen, als dasjenige von LUSTIG
und GALEOTTI; mit 0,001 Mg. kann man
60% der Ratten immunisieren. Beim Aufbe-
wahren verliert sich die Giftigkeit rasch. Als
haltbarer empfahl der Autor spater ein Pro-
dukt, welches er TRK nannte und welches
aus einer Mischung von Natriumsulfat und
abgetoeteten Bazillen besteht, welche er bei
De culturas de 48 horas em agar emulsionadas em solução fisiológica e mortas pelo calor, cloroformio ou toluol, procurámos obter uma substância toxica, que se libertasse do bacilo e, inoculando os germes mortos em ratos e coelhas verificámos que a inoculação de germes aquecidos a 65 graus, durante uma hora não é mortal, concordando este resultado com o da comissão alemã para estudo da peste. Cerca de 30% dos ratos inoculados com bacilos mortos pelo cloroformio morriam 4 a 5 dias depois.

A técnica de LUSTIG e GALLEOTTI, repetida, permitiu-nos obter um produto tóxico, que, embora mortal para ratos de 100 grs. de peso, quando inoculado com 1, 3 - 1, 5 e 2 mgs., não o era para todos os ratos inoculados e imunizou cerca de 40% deles, quando inoculados com dose submortal, como seja 0,8 mgs.

Nos ensaios para extração da nucleoproteína de ROWLAND [1912] preferimos destruir pelo cloroformio os germes que, contrário ao que escreve este autor, assim nos forneceram produto de toxidez mais elevada que o extraído do bacilo pelo calor, porque a temperatura necessária de 60 graus diminuía o poder tóxico da nucleoproteína. MARKL [1898] já tinha verificado que bacilo da peste morto pelo cloroformio tem poder tóxico mais elevado do que, quando morto pelo calor.

O cloroformio dá logar à formação de um produto atóxico instável e reversível, que de novo adquire a toxidez, quando tratado pelo sulfito de sódio. A ação tóxica da nucleoproteína assim obtida diminui rápidaemente. Procurámos evitar este inconveniente, secando o produto, sem que assim obtivéssemos resultado mais favorável. Notámos ainda que a toxidez da nucleoproteína se prende à virulência do gume, assim é, que durante o correr do trabalho e por motivo de uma Temperatur von 37 herstellt, in einem Gefässes mit Eis rasch erstarren lasst und stueckweise in Glaesern mit Glasstoepefn aufbewahrt. Zum Gebrauche wird ein Stueck in 0,85% Salzloesung bei 36° aufgelost, auf 0° abgekuhlt und dann filtrirt.

Eine halbstundige Erhitzung auf 55 oder 60° reduziert die Giftigkeit auf 1/4, resp. 1/9. Aus 48stündigen, in physiologischer Lösung suspendierten und durch Hitze, Chloroform oder Toluol abgetoeten Kuturen, versuchte ich eine toxische Substanz zu gewinnen, welche aus den Bazillen ausgezogen koenten; bei Verimpfung der toten Keime auf Ratten und Meerschweinchen, konstatierte ich, dass auf 65° erhitzte Bazillen nicht toetlich wirken, was mit den Resultaten der deutschen Kommission zum Studium der Pest ubereinstimmt. Von den Ratten, denen mit Chloroform abgetoetete Bazillen einverleibt wurden, starben 30% 4-5 Tage darauf.

Durch Wiederholung der Technik von LUSTIG und GALLEOTTI gelang es mir ein toxisches Produkt zu erhalten, welches in Dosen von 1, 0-1, 5 oder 2 Mgr. fuer Ratten von 100 Gramm Gewicht zwar toetlich war, aber nicht immer, wahren es in submortaler Dose (z. B. 0,8 Mgr.) verimpt, 40% derselben immunisierte.

Bezi den Versuchen, das Nukleoprotein von ROWLAND zu isolieren, zog ich es vor, die Keime durch Chloroform zu toeten, da sie mir so -im Gegensatz zu den Angaben des Autors--eine giftigeres Produkt lieferten, als die durch Hitze abgetoeteten Bazillen, weil die noetige Temperatur (60°) die Toxicitat des Nukleoproteins herabsetzte. MARKL stellte schon 1898 fest, dass durch Chloroform abgetoetete Bazillen hoehere Giftigkeit besitzen, als durch Hitze abgetoetete.

Das Chloroform fuhrt zur Bildung eines atoxischen und reversibeln Produktes, welches bei Behandlung mit Natrium sulfat wieder giftig wird. Die Wirksamkeit des so erhaltenen Nukleoproteins nimmt rasch ab; ein Versuch diesem Uebelstand durch Trocknen abzuwenden, ergab mir kein beseres Resultat. Ich beobachtete auch, dass die Giftigkeit des Nukleoproteins von der Virulenz der Keime abhaengt; so ergab sich, als der Stamm, mit dem ich gewoehnlich arbeitete, wahrend dieser Studien (aus Gruender,
Die nicht von mir abhängen) zwei Monate lang nicht weiter auf Ratten verimpft wurde, dass nun das gewonnene Nukleoprotein erst nach 48 Stunden und in hoherer, als der gewöhnlichen Dose todtlich wirkte. Doch beobachtete ich nach einigen Passagen durch Ratten wieder dieselbe todtliche Minimaldose.

Nachstehend fuhre ich einige Versuche an, welche zur Feststellung der toxischen und immunisierenden Wirkung des ROWLAND'schen Produktes angestellt wurden.

Pestbazillen aus 14taegigen Rattenpassagen, mit Chloroform getoetet und mit Natriumsulfat extrahiert.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Verimpfte Dosis</th>
<th>Resultat</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,05 mg.</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1 mg.</td>
<td>+ binnen 24 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,05 mg.</td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,04 mg.</td>
<td>+ 72 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,03 mg.</td>
<td>+ 24 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,02 mg.</td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,01 mg.</td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>1 mg.</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Bei allen Versuchen schwankte das Gewicht der Ratten zwischen 95 und 105 Gramm und das Resultat wurde nach 48 Stunden kontrolliert. In obiger Serie war die kleinste todtliche Dose fuer Ratten von dem angegebenen Gewichte 0,1 Mgr. Die Beobachtung, dass die, mit der zehnfach todtlichen Dosis geimpfte Ratte am Leben blieb, erklärt sich aus einer geringeren Sensibilität oder grosseren Resistenz gegen das Virus und wiederholte sich relativ haeufig bei den verschiedenen Serien, die ich im Verlaufe meiner Studien impfte.

Dies war auch nicht immer die niedrigste todtliche Dose, die beobachtet wurde; so toetete bei einer anderen, unter denselben Bedingungen beobachteten Serie das Nukleoprotein die Tiere in weit geringerer Dose:

| 0,1 Mgr.         | + 48 h.     |
| 0,05 mg.         | + 72 h.     |
| 0,04 mg.         | + 24 h.     |
| 0,03 mg.         | + 24 h.     |
| 0,02 mg.         | + 24 h.     |
| 0,01 mg.         | bleibt am Leben |
| 1 mg.            | bleibt am Leben |
Não só, com raridade se reproduziu este fato, mas ainda, em outra série em que em nada modificámos as condições da experiência a dose mínima mortal foi de 0,3 mg.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Dose (mg)</th>
<th>Resultado</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,1</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,3</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,4</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,5</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,6</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Downde se depreende a dificuldade de obter um produto de valor tóxico constante. Entretanto, empregando a mesma técnica e o mesmo germe, os resultados mais constantes se obtinham com 0,1 mg. Se, com o mesmo germe fazíamos a simples extração pela solução fisiológica, a D. M. M. era de 0,7 mg.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Dose (mg)</th>
<th>Resultado</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,8</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,7</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,6</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>0,5</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>0,4</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>0,3</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td>vivo</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Downde se conclui a necessidade de empregar 7 vezes a D. M. M., verificada para o produto extraído pelo sulfato de sódio.

Em outros ensaios, empregámos um bacilo cuja virulência é mantida em inoculações quinzenais em cobaias. Deste germe, que de ha muito não se inocula em rato, extraiamos um produto, que em alguns ensaios matava ratos na dose de 0,2 mg. e em outros exijia 0,3, 0,4 e 0,5 mg.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Dose (mg)</th>
<th>Resultado</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>24 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,8</td>
<td>24 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,6</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,4</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td>vivo</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Se, do mesmo germe fizémos simplesmente a extração pela solução fisiológica obtemos o seguinte resultado.

Nicht nur wiederholte sich dieses Faktum in seltenen Fällen, sondern es wurde sogar in einer anderen Reihe unter unveränderten Bedingungen eine Minimaldose von 0,3 Mgr. beobachtet:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Dose (Mgr)</th>
<th>Resultado</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,1</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,3</td>
<td>+ binnen 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,4</td>
<td>+ 72 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,5</td>
<td>+ 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,6</td>
<td>+ 48 St.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Man ersieht hieraus die Schwierigkeit, ein Produkt mit einem konstanten Toxizitätswert zu gewinnen. Doch erhielt ich bei Anwendung derselben Technik und desselben Stammes die konstantesten Resultate mit 0,1 Mgr. Wenn ich dieselben Bazillen mit physiologischer Kochsalzlösung auszog, so war die kleinste toetliche Dose 0,7 Mgr.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Dose (Mgr)</th>
<th>Resultado</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>+ binnen 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,8</td>
<td>+ 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,7</td>
<td>+ 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,6</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,5</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,4</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,3</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Man ersieht daraus die Notwendigkeit das Siebenfache der fuer das mit Natriumsulfat gemachte Extrakte bestimmten toetlichen Minimaldosis anzuwenden.

Zu anderen Versuchen gebrauchte ich einen Stamm, dessen Virulenz durch zweiwöchentliche Meerschweinchenpassagen erhalten wurde. Von diesem seit langem nicht mehr auf Ratten verimpften Stamm gewann ich ein Produkt, welches bei einigen Versuchen Ratten in der Dose von 0,2 Mgr. toetete, wahrend andere Male 0,3, 0,4 und 0,5 Mgr. noetig waren.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Dose (Mgr)</th>
<th>Resultado</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>+ binnen 24 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,8</td>
<td>+ 24 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,6</td>
<td>+ 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,4</td>
<td>+ 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,2</td>
<td>+ 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td>bleibt am Leben</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Machte ich von denselben Keimen einen Auszug bloß mit physiologischer Loesung, so erhielt ich das folgende Resultat:
1 mg. + 48 h. 
0,8 mg. + 48 h. 
0,6 mg. vivo. 
0,4 mg. vivo. 
0,2 mg. vivo. 
0,1 mg. vivo. 

Entretanto, tão irregulares foram os resultados obtidos em diversas séries que não chegámos a firmar qual a D. M. M. 

De outro bacilo da peste avirulent a e que durante anos não é inoculado em animal de laboratório, não conseguimos extrair produto tóxico algum com solução fisiológica e, pelo sulfato de sodio obivemos uma substância mortal para rato na dose de 1,5 mg. inoculado por via peritoneal e de 1 mg., por via subcutanea.

Depois de ensair o valor tóxico da endotoxina procurámos estudar o valor imunitário. O animal de escolha foi ainda o rato do peso anteriormente mencionado. A quantidade inoculada foi de 0,05, 0,03 e 0,01 mg. Quatro dias depois, os animais recebiam, por via subcutanea, pequena dose de germe vivo. Nos animais assim tratados, a mortalidade, que era de 100 % entre os testemunhos, passou a ser de 48 %.

Terminada esta parte, estudámos comparativamente o soro obtido por iniciações subcutaneas e intravenosas de 500 mg. da nucleoproteína de ROWLAND em cavalo, que reajia com elevação de temperatura e perda de peso e o soro antipestoso de Manguinobio por inoculação crescente de bacilos mortos e vivos.

A primeira tentativa para obtenção de soro antipestoso antitóxico devolvia a MARKL que em 1898, 1901 e 1903 conseguiu antitoxina para toxina de filtrado de cultura antiga.

Segue-se a ele, DEAN que em 1902 inoculou em cavalo, filtrado de cultura de 10 mezes, obtendo um soro, de que 1 cc. neutralizava 150 a 450 D. M. M.

Entre os soro antiendotoxicos destacam-se os de LUSTIG e GALLEOTI que inoculou 97 grs. de sua nucleoproteína, obtendo um soro com propriedades curativas e pre-

1 Mgr. + binnen 24 St. 
0,8 e bleibt am Leben 
0,6 e bleibt am Leben 
0,4 e bleibt am Leben 
0,2 e bleibt am Leben 
0,1 e bleibt am Leben

Doch waren die bei verschiedenen Serien erhaltenen Resultate so unregelmässig, dass ich die kleinste toetliche Dose nicht feststellen konnte.

Bei einem andern avirulenten Peststamme, der Jahre lang nicht auf Tiere verimpft wurde, gelang es mir nicht mit physiologischer Loesung irgend ein toxisches Produkt zu extrahiren, wachrend ich mit Natriumsulfat eine Substanz erhielt, welche fuer die Ratte toetlich war, wenn intraperitoneal 1,5 Mgr. oder subkutan 1 Mgr. verimpft wurde.

Nachdem ich den toxisischen Wert der Endotoxines geprüft hatte, versuchte ich seinen immunisierenden Wert zu studieren, wobei auch Ratten von dem oben erwähnten Gewichte gewahlt wurden. Die verimpften Dosen waren 0,05—0,03 und 0,01 Mgr. Vier Tage später erhielten die Tiere subkutan eine kleine Quantitaet lebender Bazillen. Bei so vorbereiteten Tieren betrug der Mortalität 48 % gegen 100 bei Kontrolltieren.


Den ersten Versuch zur Herstellung eines antitoxischen Pestserums verdanken wir MARKL, der 1898, 1901 und 1903 füber das Toxin des Filtrates alter Kulturen ein Antitoxin erzielte.

Auf ihn folgt DEAN, der 1902 ein Pferd mit dem filtrat einer 10monatlichen Kultur impfte und ein Serum erhielt, von dem 1 Mgr. 150—450 toetliche Mininaldosen neutralisierte.

Unten den antiendotoxischen Serumsorten zeichnen sich die von LUSTIG und GA-
ventivas e o de ROWCAND de que 0,1 e 0,04 cc. tem ação protetora sobre animais posteriormente inoculados com 3 D. M. M. 

Estabelecido da media de ensaios que se pode aceitar a quantidade de 0,1 mg. de nucleoproteína extraída do bacilo habitualmente inoculado em rato, misturámos 3 D, M, M. e quantidades variáveis dos dois soros, deixando a mistura em banho maria a 37 grados durante meia hora, para depois inocular por via subcutanea. Rejistámos assim o seguinte resultado:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Soro de cavalo inoculado com nucleo-proteína</th>
<th>Ratos</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,3 mg. 1 cc.</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,75</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,25</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,1 + 24 h.</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,1 mg.</td>
<td>+ 24 h</td>
</tr>
</tbody>
</table>

- 

Admitido o prazo de 48 horas para verificação dos resultados, teremos que animal algum dos inoculados com soro antibacteriano morreu neste espaço de tempo. Em data posterior, morreram todos. Mesmo nos animais inoculados com soro antiendotoxins, é comum sobrevir posteriormente a morte.

Se diminuirmos a quantidade de nucleoproteína para uma unica D. M. M., melhor será o resultado obtido com o soro antibacteriano:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Soro antistresso</th>
<th>Manguinhos</th>
<th>Ratos</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,3 mg. 1 cc.</td>
<td></td>
<td>+ 6 dias</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,75</td>
<td></td>
<td>+ 13 &lt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5</td>
<td></td>
<td>+ 11 &lt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,25</td>
<td></td>
<td>+ 12 &lt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,1</td>
<td></td>
<td>+ 6 &lt;</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5</td>
<td></td>
<td>vivo.  &lt;</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1 mg.</td>
<td></td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

LEOTTI und die von ROWLAND aus; erstere verimpften 96 Gramme ihres Nukleoproteins und erhielten ein Serum mit Schutz und Heilwirkung; das Serum des letzteren schufzte in Dosen von 0,1 und 0,4 Kzm. Tiere, welche nachher mit dem Dreifachen der minimalen toxischen Dosis geipmpften. 

Nachdem aus dem Durchschnitt der Versuche die Dose von 0,1 Mgr. des Nukleoproteins (aus den Stammen mit regelmaessigen Rattenpassagen extrahirt) festgestellt war, mischte ich drei minimale toxische Dosen mit verschiedenem Mengen der beiden Sera, um die Mischung nach halbstundigem Aufenthalt im Marienbade von 37° subkutan zu verimpfen. Dabei erhielt ich folgendes Resultat:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Serum des mit Nukleoprotein</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Nukleoprotein immunis. Pferdes</td>
</tr>
<tr>
<td>0,3 Mgr. 1 Kzm. Bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,25</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,1 + binnen 24 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

- 

Pestheilserum von Nukleoprotein Manguinhos

<table>
<thead>
<tr>
<th>0,3 Mgr. 1 Kzm. binnen 6 Tage</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,25</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,1 +</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

- 

Haette ich die Resultate nach 48 Stunden konstatirt, so warke keines der mit dem antikörperlichen Serum geipmpften Tiere gestorben. Doch trat der Tod spater bei allen ein. Selbst bei den mit antiendoxikem Serum behanderten Tieren fuhrt der spateren Verlauff nicht selten zum Tode.

Wird die Menge des Nukleoproteins auf eine tottische Minimaldoxis erniedrigt, so wird das mit dem antikörperlichen Serum erzielte Resultat noch besser:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Pestheilserum v Nukleoprotein Manguinhos</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,1 Mgr. 1 Kzm. Bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>&lt; &lt; 0,5 + binnen 48 St.</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Em outro ensaio, em que numerosas passagens de bacilo da peste tinham aumentado a virulência do germe, obtivemos o seguinte resultado:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Nucl. Prot.</th>
<th>Soro de cavalo inoculado com nucleoproteína</th>
<th>Ratos</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,05 mg.</td>
<td>1 cc.</td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,05 mg.</td>
<td>0,1 cc.</td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,05</td>
<td></td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Mantendo fixa a quantidade de soro e variando a de nucleoproteína temos:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Nucl. Prot.</th>
<th>Soro de cavalo inoculado com nucleoproteína</th>
<th>Ratos</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,1 cc.</td>
<td>3 D. M. M.</td>
<td>vivo</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td></td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td></td>
<td>+ 24 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td></td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td></td>
<td>+ 24 h.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Outro ensaio, aumentando proporcionalmente a quantidade de nucleoproteína e soro, mostrou-nos que a ação neutralizante não se exercia, segundo a lei das proporções multiplas.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Nucl. Prot.</th>
<th>Soro de cavalo inoculado com nucleoproteína</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1 m.</td>
<td>1 cc.</td>
</tr>
<tr>
<td>1</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,75</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,25</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

Dos diversos ensaios, resulta que não conseguimos obter de cultura pura de bacilo da peste em meio líquido um produto toxicó li-

<table>
<thead>
<tr>
<th>Nucl. Prot.</th>
<th>Soro de cavalo inoculado com nucleoproteína</th>
<th>Ratos</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>0,05 mg.</td>
<td>1 cc.</td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,05 mg.</td>
<td>0,1 cc.</td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,05</td>
<td></td>
<td>+ 48 h.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Bei einem anderen Versuche mit einem Stamme, dessen Virulenz durch zahlreiche Passagen erhoehet war, erhielt ich folgendes Resultat:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Serum des mit Nukleoprotein behandeltem Pferdes</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Nukleoprotein Pferdes</td>
</tr>
<tr>
<td>0,05 Mgr. 1 Kzm.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,75 Bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,5 Bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,25 Bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1 Bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>0,5 Bleibt am Leben</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Bei konstanter Serummenge und wechselnden Nukleoproteindosen erhielt ich:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Serum des mit Nukleoprotein behandeltem Pferdes</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Nukleoprotein Pferdes</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1 Kzm. 3 D. M. L.</td>
</tr>
<tr>
<td>5 Bleibt am Leben</td>
</tr>
<tr>
<td>7 + binnen 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>10 + binnen 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>12 + binnen 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>15 + binnen 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>20 + binnen 48 St.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Ein anderer Versuch, bei welchem die Nukleoprotein und Serummengen proportiell erhoehet wurden, zeigte, dass die neutralisierende Wirkung nicht nach dem Gesetz der multiplen Proportionen erfolgt.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Serum des mit Nukleoprotein behandeltem Pferdes</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Nukleoprotein Pferdes</td>
</tr>
<tr>
<td>1,0 Mgr. 1 Kzm. + binnen 48 St.</td>
</tr>
<tr>
<td>0,75</td>
</tr>
<tr>
<td>0,5</td>
</tr>
<tr>
<td>0,25</td>
</tr>
<tr>
<td>0,1</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Aus den verschiedenen Versuchen geht hervor, dass es mir nicht gelang, aus Reinkulturen von Pestbazillen in Fluessigkeiten
vre de germes, capaz de imunizar animais ativamente, fornecendo estes um soro com ação neutralisante específica Obtivemos de germes cultivados em meio solido, fazendo extração por meio de agentes químicos, um produto tóxico, que, mortal para ratos não o era com a regularidade, que se exige para as toxinas e que, inoculado em cavalo produziu um soro exercendo ação neutralisante sobre o produto, porem não segundo a lei das proporções múltiplas, faltando lhe por isto qualidade essencial para ser considerada verdadeira toxina.

Manguinhos, 3 de Abril de 1914.

Manguinhos, den 3 ten April, 1914.
BIBLIOGRAFIA.

Litteratur.

KOLLE W. 1903 Studien ueber das Pestgift. Festschrift zu R. KOCH’s 60 ten Geburtstag.– Jena.
KOLLE W, und OTTO R. 1902
LUSTIG A. UND GALLOTI G. 1912 The preparation of antitoxic plague sera. – The Journ. of Hyg., Plaguesupplement II: Seventh report on plague investigation in India.
MARKL, G. 1901 Preliminary observation on the protective and curative value for the rats of the serum of a horse immunised with a toxic nucleoprotein extracted from the plague bacillus.– The Journ. of Hyg., Plague suppl. I: Sixth report on plague investigation in India, pg. 11–19.
ROWLAND SYDNEY 1911 The onset and duration of the immunity consequent on the inoculation of the plague nucleoprotein. Reports on plague investigations in India. The Journal of Hygiene, Vol. XII, pg. 367–372.
ROWLAND SYDNEY 1910 Experiments on the vaccination of animals against plague. First report on investigations into plague vaccines. Extra plague number. The Journal of Hygiene Vol. X.