

Orale Immunisierung mit abgetöteten Bakterien

M. Stanic

Aus dem Schweiz. Serum- und Impfstitut Bern (Wissenschaftlicher Leiter: Dr. J. Ungar)

Artikel eingegangen am 17. Juni 1971

Zusammenfassung

Das Problem der präventiven Maßnahmen gegen Enteroinfektionen ist nach wie vor aktuell und von Zeit zu Zeit sogar akut. Es wird über veränderte epidemiologische Faktoren in der Welt gesprochen, die als Folge der Massenbewegungen im allgemeinen und des auf alle Kontinente ausgedehnten Massentourismus im besonderen zu betrachten sind.

Die orale Immunisierung bietet eine Möglichkeit, sich vor Enteroinfektionen zu schützen. Es werden die orale Immunisierung gegen Typhus und Paratyphus, die schon eine gewisse Tradition haben, und ein neuer Vorschlag der oralen Immunisierung gegen Cholera besprochen.

Das Problem der präventiven Maßnahmen gegen Enteroinfektionen ist nach wie vor aktuell und von Zeit zu Zeit sogar akut. In der Nachkriegszeit ist von der epidemiologischen Sicht her neben den bisher bekannten klassischen Elementen der Verbreitung der Darminfektionen noch ein zusätzliches entstanden. Dies ist der Tourismus, der in den letzten Jahren gewaltig angestiegen ist. Dieser Massentourismus hat uns epidemiologisch vor ganz neue Situationen gestellt. Es ist zurzeit möglich und muß vorausgesehen werden, daß überall, wo dieser Tourismus hingelangt, Epidemieherde blitzartig auftreten können und daß Länder und geographische Regionen von neuen Epidemien heimgesucht werden, welche bisher dort unbekannt waren.

So können wir heute von Blitzepidemiengefahren sprechen. Zum Teil haben wir schon einige Kostproben davon erhalten, denken wir nur an die vor ungefähr zwei Jahren per Flugzeug eingeschleppte Pockenepidemie in Deutschland.

Sind wir, beschränken wir unsere Anschauungen nur auf Europa und im besonderen auf die Schweiz, gegen solche Epidemien gewappnet?

Aus dieser Betrachtung heraus möchte ich mich nun mit dem Typhus, Paratyphus und der Cholera vom Standpunkt der Möglichkeit der oralen Immunisierung beschäftigen.

In diesem Jahr gedenken wir des 100. Geburtstages von *Alexandre Besredka*, mit dessen Namen die Idee und der Begriff von der lokalen Immunität verbunden sind. Er begann mit den Versuchen der lokalen Immunität auf der Haut. Als Antigen wendete er Bakterienkulturen an, die solange bebrütet wurden, bis sie den Nährboden, auf dem sie wuchsen, völlig erschöpft hatten. Durch Ausscheidung und Ansammlung von eigenen Metaboliten gingen sie dann zugrunde. Dieses Produkt nannte er Antivirus.

Später studierte er anhand seiner Resultate mit der lokalen Anwendung des Antivirus auf der Haut den Effekt der oral eingenommenen bakteriellen Suspensionen gegen Typhus-, Paratyphus-, Coli-, Dysenterie- und Cholera-Infektionen [1]. Auch Inhalationen von bakteriellen Antigenen studierte er als mögliche Art von lokaler Immunisierung der Luft-Atemwege. Obwohl er mit diesen Methoden gewisse Ergebnisse erzielte, blieb ein überzeugender Erfolg aus. Es fehlte damals, in der Zeit von 1910 bis 1930, an Methoden und tierischen Modellen, an denen man die Resorption der Antigene durch die Haut und Darmschleimhaut verfolgen und die Produktion der Antikörper einerseits und den prophylaktischen Wert dieser Impfstoffe durch ausgedehnte Feldversuche und statistische Beweise andererseits nachweisen konnte.

In Zusammenarbeit mit seinem Lehrer *Metchnikoff* verwendete er für seine oralen Immunisierungsversuche Schimpansen [2]. Obwohl keine überzeugenden Resultate erzielt wurden, erwiesen sich Schimpansen als sehr gute Versuchstiere. Sie werden daher auch heute wieder für das Studium der oralen Immunisierung eingesetzt.

In den letzten Jahren kam man auf die Versuche *Besredkas* zurück. Wie bekannt, befinden sich schon seit Jahren als ein Überbleibsel aus der Ära *Besredkas* orale Impfstoffe gegen Typhus und Paratyphus im Handel.

In Frankreich wird das Präparat Bilivaccin, in Deutschland das Typhoral und in der Schweiz das Taboral hergestellt. Es sind dies durch Hitze abgetötete Typhus- und Paratyphuskeime, die in Form von Tabletten und Dragées geprägt werden. Als Zusatz enthalten sie einen Teil Rindergalle, der die Resorption der Antigene erleichtern soll. Auch in Rumänien, in der Tschechoslowakei und in der Sowjetunion wird so eine Art des oralen Impfstoffes hergestellt.

Unser Taboral besteht aus $12 \cdot 10^9$ Keimen, und zwar aus $6 \cdot 10^9$ Typhus- und $6 \cdot 10^9$ Paratyphus-A- und Paratyphus-B-Keimen *ana partes*. Die Keime werden im Fermenter gezüchtet, mit Aceton abgetötet und in Dragées geformt.

Die Behringwerke produzieren ihr Typhoral mit $100 \cdot 10^9$ Keimen, ebensoviel hat Bilivaccin. *Karolcek* und seine Mitarbeiter in der Tschechoslowakei verwenden auch $100 \cdot 10^9$ Keime in flüssiger Form [3]. Wie weit die Anwendung solcher Impfstoffe heute vorgezogen ist, zeigt die Tatsache, daß die Schulkinder in Rumänien diesen Impfstoff als Prophylaxe gegen Typhus und Paratyphus erhalten [4]. In Deutschland wird zurzeit auch die Bundeswehr mit diesem Impfstoff geimpft [5].

Auch heute noch haben wir Schwierigkeiten mit der Darstellung der Antikörper zur Beurteilung des Schutzwertes einer oralen Vakzine. Die älteste Methode, der Widalttest, versagt, da die Agglutinine im zirkulierenden Blut nach oraler Immunisierung nicht regelmäßig erscheinen. Die anderen Methoden sind die Bestimmung des opsonischen Index, die bakteriziden Antikörper und der Hämagglutinationstest. Der letztere gab die meisten zufriedenstellenden Werte. *Raettig* [6], der in der letzten Dekade am intensivsten mit der oralen Immunisierung gegen Typhus beschäftigt war, verwendete den passiven hautanaphylaktischen Test, den sogenannten PCA-Test (passive cutaneous anaphylaxis

test [7]) und als zuletzt entwickelte Methode die Modifikation der Agar-Plaques-Technik nach *Jerne*. Er hat mit seinen Mitarbeitern festgestellt [8, 9], daß nach der oralen Immunisierung ein anderer Immunisierungsablauf als nach der parenteralen stattfindet. Sie haben festgestellt, daß nach intravenöser Immunisierung in den lymphatischen Organen das Maximum an plaquebildenden Zellen (p.f.c., plaque forming cells), etwa deren 400 bis 100 pro 10^6 der Gesamtzellen, erreicht wird. Nach oraler Immunisierung erreicht die Milz erst nach 5 Tagen einen Gipfel von etwa 200 p.f.c. pro 10^6 Zellen. Am 18. Tag kommt es im Darm zu einem erneuten Anstieg der p.f.c., der bis zu 100 pro 10^6 Gesamtzellen ausmacht. Das ist eine Besonderheit der Immunreaktion nach der oralen Impfung. Die Autoren haben noch festgestellt, daß nur im Darm, und zwar während des zweiten Maximums am 18. und 19. Tag, eine neue Zellform auftritt und Ähnlichkeit mit Reticulumzellen aufweist. Die Antikörper, die in diesen Zellen entstehen, gehören zu der IgM- und IgG-Klasse.

In unseren Versuchen mit Taboral konnten auch wir oft keine zirkulierende Antikörper gegen Vi-, O- und H-Antigene nachweisen, oder die erhaltenen Widal-titer, die auch auf eine anamnestiche Reaktion hindeuten, waren sehr niedrig. In einer experimentellen Taboral-Serie erhöhten wir die Zahl der Typhuskeime auf total $100 \cdot 10^9$ bei gleichzeitiger Weglassung von Paratyphus-A- und B-Keimen. *Hornick* und seine Mitarbeiter aus Baltimore [10] verabreichten unser Taboral einer Gruppe von Freiwilligen in einem Zuchthaus. Sie fanden auch sehr niedrige Titer der Vi-, O- und H-Agglutinine im Blut. Sie sahen auch keinen Schutzeffekt, wenn sie die Freiwilligen mit einer starken Infektionsdosis von Typhuskeimen belasteten. Zurzeit läuft ein Feldversuch mit Taboral in einem endemischen Gebiet Indiens, und zwar unter Aufsicht der Weltgesundheitsorganisation. Den

letzten Meldungen zufolge konnte man in diesem Gebiet einen signifikanten Rückgang der Morbidität feststellen.

Burrows und seine Mitarbeiter entdeckten die Existenz der Stuhlantikörper, Coproantibodies, nach der Einnahme von Cholera-Vibrionen [11]. Auch Freter [12, 13, 14] fand Stuhlantikörper nach einem Versuch der oralen Immunisierung von Freiwilligen mit abgetöteten Cholera-Vibrionen. Durch Verordnung von Glaubersalz ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) bekamen die Versuchspersonen einen mäßigen Durchfall, so daß im breiartigen Stuhl die Antikörper leichter zu isolieren waren. Diese wurden nach der Methode von Farr [15] bestimmt, und zwar durch deren Markierung mit ^{131}I . Nach diesen Forschungen sind Stuhlantikörper nicht von beständiger Natur. Kasai [16] meint, daß dafür die Existenz von sogenannten Agglutinin-Inhibitoren verantwortlich sei, die zur spontanen Tendenz zu präzipitieren führten. Ein zweiter Grund für den raschen Schwund dieser Antikörper wäre durch die proteolytische Verdauung zu erklären.

Auch wir merkten schon vor mehreren Jahren an unseren freiwilligen Mitarbeitern im Institut, an Mäusen und Kaninchen, daß nach oraler Einnahme einer flüssigen Cholera-Vibrionen-Suspension im zirkulierenden Blut Agglutinine und vibriozide Antikörper festzustellen waren. Dies war sozusagen ein Novum gegenüber den Erfahrungen mit der oralen Typhus-Immunisierung. In Tierversuchen gaben wir den Kaninchen an drei aufeinanderfolgenden Tagen 10 ml einer gemischten Inaba-Ogawa-Vibrio-Cholerasuspension mit $18 \cdot 10^9$ Keimen/ml. Die agglutinierenden Antikörper aus der Blutzirkulation gaben einen Titer mit dem Inaba-Stamm von 1 : 5120 und mit dem Ogawa-Stamm von 1 : 2500, während die vibriozidalen Antikörper bei dem Inaba-Stamm einen Titer von 1 : 1280 und 1 : 1520 ergaben und die mit dem Ogawa-Stamm einen Titer von 1 : 1520

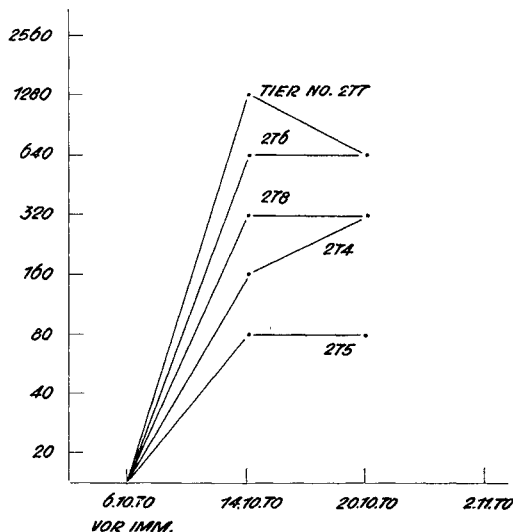


Abb. 1 Orale Immunisierung der Kaninchen mit abgetöteter Cholera-Suspension. Agglutinierende Antikörper. Stamm Inaba NIH-35-A-3.

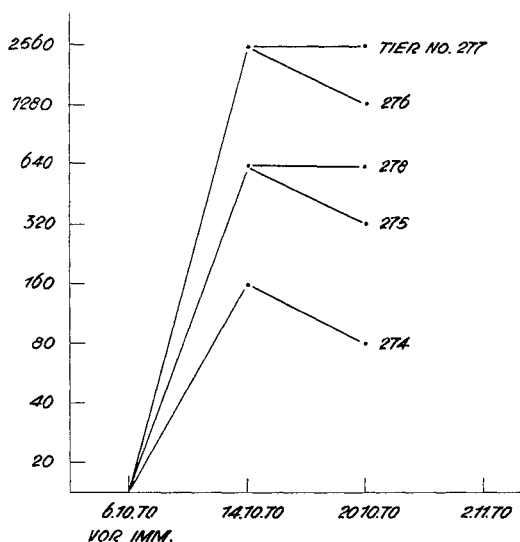


Abb. 2 Orale Immunisierung der Kaninchen mit abgetöteter Cholera-Suspension. Agglutinierende Antikörper. Stamm Ogawa NIH-41.

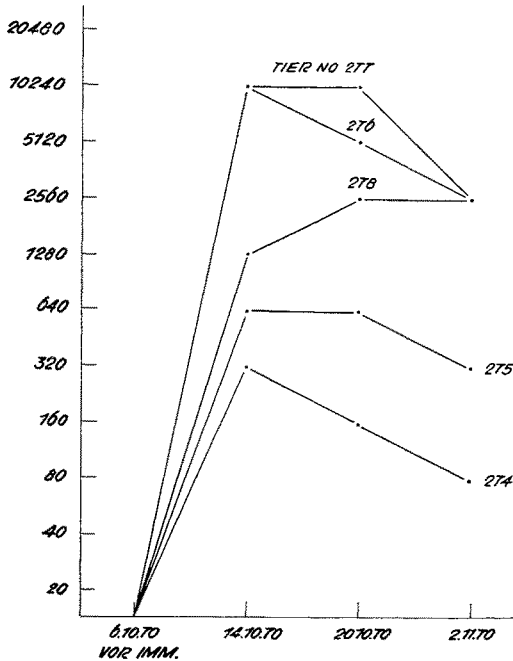


Abb. 3 Orale Immunisierung der Kaninchen mit abgetöteter Cholera-Suspension. Vibriozidale Antikörper. Stamm Inaba 35-A-3.

bis 1 : 10 240 erreichten (Abb. 1, 2, 3, 4). Die angewandten Methoden dieser Titer-Bestimmungen waren die Mikrowidaltechnik und die mikrovibriozidale Methode nach *Benenson* [17, 18]. Auf Abb. 5 sieht man einen eindeutigen Beweis für die spezifischen Blutantikörper. Hier wurde eine Immunodiffusion gemacht, wobei im Zentrum ein durch orale Immunisierung gewonnenes Kaninchenserum angebracht wurde. In den peripheren Löchern befinden sich nebst der verwendeten Vakzine auch durch verschiedene Verfahren gewonnene Cholera-Antigene. Die innerste Präzipitationslinie gibt einen sehr gut erkennbaren geschlossenen Ring, während die äußeren 1 bis 2 Linien je nach der Zusammensetzung und Herstellungsverfahren der Antigene mit dem Serum reagieren.

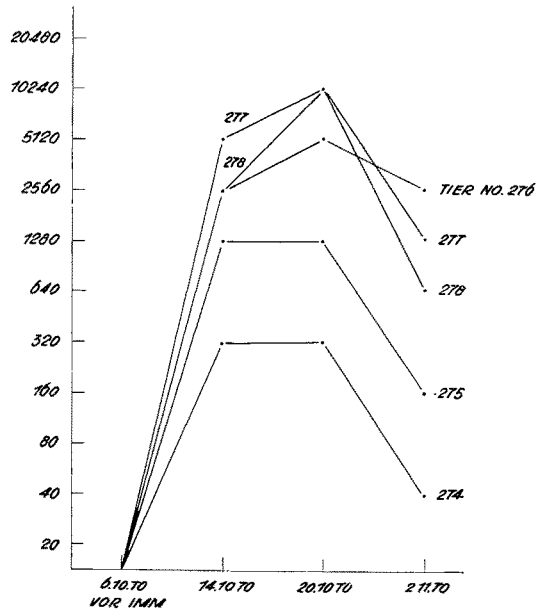


Abb. 4 Orale Immunisierung der Kaninchen mit abgetöteter Cholera-Suspension. Vibriozidale Antikörper. Stamm Ogawa NIH-41.

Die erzielten und in Kürze geschilderten Resultate der Forschung nach oralen Impfstoffen sind natürlich nur als preliminäre Resultate anzusehen. Die Idee, daß tote und lebendige, aber attenuierte Mikroorganismen in der Darmwand durch Resorption der Antigene das immunokompetente System der Darmwand sowie das benachbarte lymphatische System spezifisch zu reizen vermögen und so eine Immunität herbeiführen, ist ohne Zweifel richtig. Die Lamina propria der Darmsubmucosa ist die erste Barriere, an die die bakteriellen Antigene oder bei einer Infektion die lebenden Bakterien stoßen und von wo aus sie die immunokompetenten Zellen sensibilisieren und zur Produktion der Antikörper anregen. Die Lamina propria war mit Recht von *Brandborg* als die Weise des Darms bezeichnet worden [19]. Ihre Morpho-

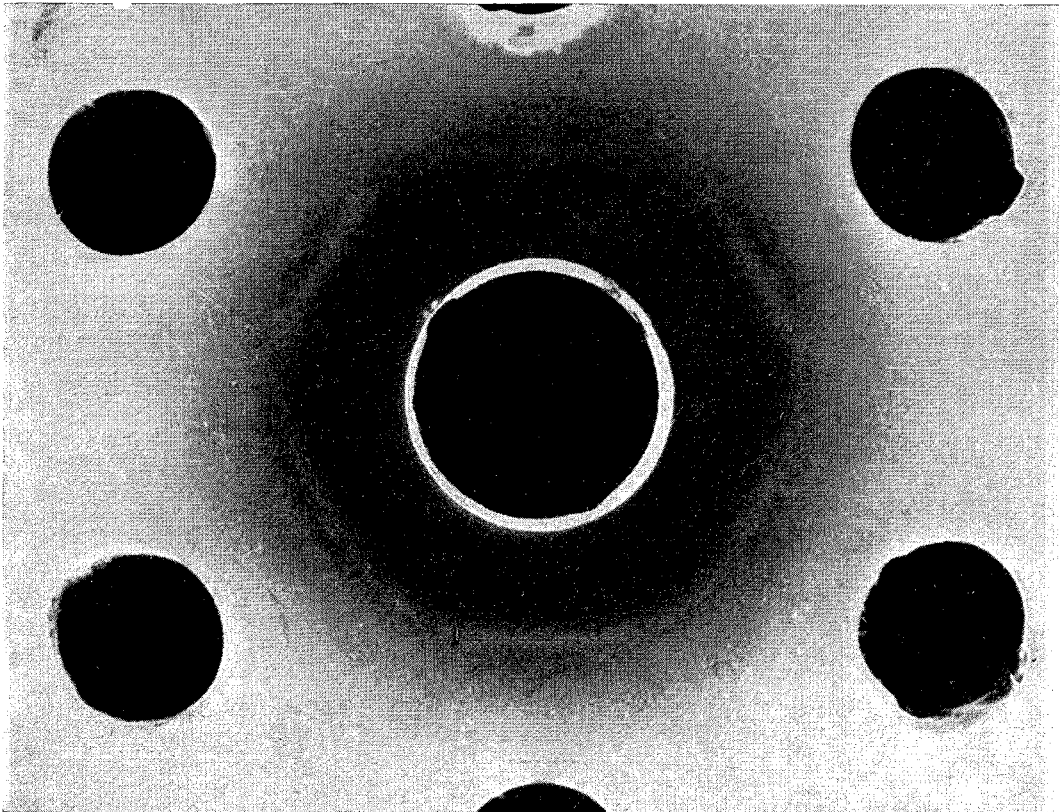


Abb. 5 Immunodiffusionsversuch. Im Zentrum ein durch orale Immunisierung gewonnenes Cholera-Antiserum. In den peripheren Löchern befinden sich durch verschiedene Verfahren gewonnene Cholera-Antigene.

logie und Funktion waren relativ wenig erforscht (Abb. 6, 7). Die weitere Forschung muß die besten Bedingungen ausfindig machen, unter welchen die Antigene unverändert das immunokompetente System erreichen. Man muß noch die richtige Form und die richtige Konzentration finden, um einen ausreichenden antigenen Impuls zu liefern. Zurzeit geben wir unseren Freiwilligen 10 ml einer flüssigen Cholera-Vibriolen-Suspension mit $18 \cdot 10^9$ Keimen per ml an drei aufeinanderfolgenden Tagen.

Wahrscheinlich ist es auch so, daß nicht jedes Antigen die Darmwand unverändert passieren kann. Dies hängt von den biochemischen Eigenschaften des Antigens und den biochemischen Leistungen des Verdauungsprozesses ab. Eines sind wir schon jetzt sicher: die Cholera-Antigene kommen unverändert durch das Darmepithel in die Lamina propria wie auch in die entfernteren lymphatischen Gewebe wie Lymphknoten, Milz und Leber hindurch. Somit ist die Produktion der Antikörper an mehreren Fronten gesichert.



Abb. 6 Lamina propria des Ileums. Zerstreutes lymphatisches Gewebe mit Keimzentren im lockeren Bindegewebe. Auch Leukozyten und Hystiozyten sind reichlich vorhanden.

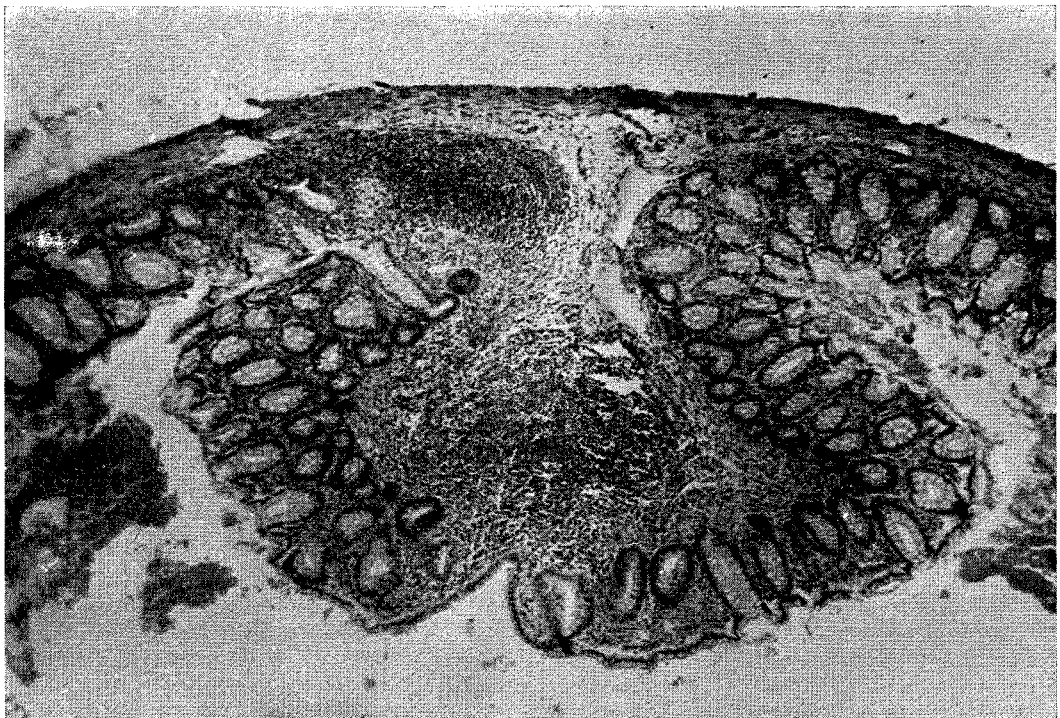


Abb. 7 Lamina propria mit deutlichen lymphatischen Knoten im Appendix.

Es entstehen also lokale wie auch zirkulierende Antikörper. Diese doppelte Barriere hindert zuerst das Eindringen der infektiösen Keime in die Darmwand, die Keime werden sogar schon im Darmlumen abgefangen. Wenn dennoch einige Keime durch die Darmwand passieren, werden sie dort bekämpft und zuletzt im Blut auch. Damit wird nicht nur die Senkung der Letalität, sondern auch vom epidemiologischen Standpunkt aus das Wichtigste, die Morbidität gewisser infektiöser Krankheiten, erreicht. Ein letzter Beweis für diese theoretisch und experimentell fundierte Auffassung ist und bleibt ein Feldversuch in einem endemischen Gebiet.

Literatur

- [1] *Besredka A.*: Antivirustherapie, Masson Paris 1930.
- [2] *Metchnikoff E. et Besredka A.*: Ann. Inst. Pasteur 25, 193 (1911).
- [3] *Karolcek J., Rusinko M., Draskovicová M., Mikulová M., Bateerová L. and Luzova D.*: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 197, 221 (1965).
- [4] *Vladoianu I. R., Dimache G., Antohi S., Vladoianu C. and Zarma O.*: Bull. Wild Hlth Org. 32, 37 (1965).
- [5] *Finger G.*: Ärztl. Prax. Nr. 16/35, 1404 (1964).
- [6] *Levanon Y., Raettig H. J. and Rossetini S. M. O.*: Experientia (Basel) 24, 600 (1968).
- [7] *Rosenberg L. T., Chandler M. H., Gordon A. S. and Fischel E. E.*: J. Immunol. 81, 136 (1958).
- [8] *Raettig H. J.*: Simposio internazionale sulla immunizzazione per via orale con vaccini batterici inattivati, Milano, 2–3 aprile 1971.
- [9] *Werner H. J.*: Simposio internazionale sulla immunizzazione per via orale con vaccini batterici inattivati, Milano 2–3 aprile 1971.
- [10] *Hornick R. B., Du Pont H. L., Dawkins A. T., Snyder M. J. and Woodward T. E.*: International Symposium of enterobacterial vaccines, p. 143, Berne, October 9–11, 1969, S. Karger Basel-München-New York.
- [11] *Burrows W., Elliot M. E. and Havens I.*: J. infect. Dis. 81, 261 (1947).
- [12] *Freter R.*: J. infect. Dis. 111, 37 (1962).
- [13] *Freter R.*: J. exp. Med. 105, 25 (1962).
- [14] *Freter R. and Gangarosa E. J.*: J. Immunol. 91, 724 (1963).
- [15] *Farr R. S.*: J. infect. Dis. 103, 239 (1958).
- [16] *Kasai N.*: Jap. J. exp. Med. 24, 199 (1954).
- [17] *Benenson A. S., Anisa Saad and Mosley W. H.*: Bull. Wild Hlth Org. 38, 277 (1968).
- [18] *Benenson A. S., Anisa Saad and Paul M.*: Bull. Wild Hlth Org. 38, 267 (1968).
- [19] *Brandborg L. L.*: Gastroenterology 57, 191 (1969).

Adresse des Autors:

Dr. med. *Mirko Stanic*, Balderstraße 29, 3000 Bern.