

Neue Erkenntnisse in der Pathogenese der Cholera

M. Stanic

Aus dem Schweiz. Serum- und Impfstoffinstitut Bern, Wissenschaftliche Leitung: Dr. J. Ungar

Zusammenfassung

Die neueren Erkenntnisse in der Forschung der Pathogenese der Cholera haben ergeben, daß es sich um ein Exotoxin handelt. Dieses ist nicht einheitlicher Natur, enthält aber einen Hauptfaktor, den man Cholera- oder darmreaktive Substanz nennt, die für die Wasseransammlung im Darm und auch für die Störung der Permeabilität der Hautkapillaren verantwortlich ist. Diese Substanz kann man unter besonderen Züchtungsmethoden der Choleraulturen gewinnen. Das Cholera-Gen ist eine nicht dialysable, thermolabile Substanz mit antigenen Eigenschaften. Versuche sind im Gange, die zeigen sollen, ob man mit dieser Substanz einen prophylaktischen Impfstoff allein oder als Komponenten zum klassischen Impfstoff herstellen kann. Durch Immunisierung der Pferde wurde ein sehr starkes Antitoxin gewonnen. Beide Produkte werden demnächst in ausgedehnten Feldversuchen in Pakistan geprüft, um den prophylaktischen und klinischen Wert zu erproben.

Durch den wirtschaftlichen, sozialen und hygienischen Aufschwung der heutigen Gesellschaft ist die Cholera als epidemische Infektionskrankheit in Europa und Amerika heute so gut wie ausgeschlossen. Nicht so war es in der Vergangenheit und nicht so ist es heute noch in den Ländern, die diesen Wohlstand noch nicht erreicht haben, wo noch Elend, Hunger und Not herrschen, wo Dürre und Überschwemmungen sich jährlich abwechseln und wo die allgemeine Bildung noch auf der Stufe von 80 bis 90 % Analphabetismus steht.

Obwohl Indien die Urheimat der Cholera ist (sie wurde dort schon in den Sanskritschriften aus dem VI. Jahrhundert als bekannt beschrieben), sind auch viele andere asiatische Länder von ihr betroffen. Nach Europa kam sie zum ersten Male im 19. Jahrhundert, wo sie durch Kriege und schlechte hygienische Anlagen der Städte besonders begünstigt war. Eine der schlimmsten Epidemien dieser Zeiten war diejenige, die im Jahre 1854 von Rußland über Skandinavien, England, Holland, Belgien, Frankreich, die Schweiz und Italien bis auf Österreich, Ungarn und die Balkanstaaten übergriff. Allein in Österreich erkrankten über 600 000 und starben über 270 000 Menschen. In Hamburg-Altona brach

1892 eine durch eine verseuchte Wasserleitung verursachte Choleraepidemie aus, woran etwa 17 000 Menschen erkrankten, wovon etwa 8600 starben. Auch während des Ersten Weltkrieges kam es zu Choleraepidemien in der österreichischen und serbischen Armee. Zum letzten Male flammte eine Epidemie im Jahre 1922 in der UdSSR auf.

Über die Ursache und den Erreger dieser Krankheit gab es durch Jahrhunderte verschiedene Meinungen und Ansichten. Die Inder glaubten schon von jeher, daß das wesentliche Medium, das die Cholera begünstigt, das unreine Wasser sei. Gegen die Cholera suchten die Inder den Schutz bei der Göttin Cholai-Bibi, deren Tempel noch heute in Kalkutta steht [1]. Auch der verdorbene Reis sollte schuld an der Verbreitung der Cholera haben. Mit der Zeit siegte aber der Glaube, daß die Cholera eine ansteckende Krankheit ist, und daß man gegen sie nur mit dem Kampf gegen den Schmutz, Schließung der Grenzen, Maßnahmen gegen Überschwemmungen und Unrat jeder Art Herr wird. So war auch die Welt der Gelehrten auf die Miasmater und Kontagionisten aufgeteilt. Sogar ein berühmter Hygieniker wie *Pettenkofer* war überzeugt, daß nebst dem Erreger günstige miasmatische Bedingungen herrschen müßten, um eine Choleraepidemie auslösen zu können, eine Hypothese, die seine «Bodentheorie» der lokalen und zeitlichen Prädisposition, atmosphärische und terrestrische Bedingungen enthielt. Diese Hypothese wurde auch dann weiter verteidigt, als *R. Koch* den *Vibrio Comma* als den Erreger der Cholera 1883 in Alexandria entdeckte. Seitdem weiß man, daß durch die häufigen Stühle der Choleraerkrankten unzählige Cholera-Vibrien ausgeschieden werden, den Boden und die Gewässer in der Umgebung infizieren und somit dem Weitergreifen der Cholera die Wege offenstehen. Die Epidemiologie der Cholera wurde erweitert, seitdem man im Jahre 1905 einen wei-

teren Biotyp, den sogenannten Vibrio El-Tor, während einer Choleraepidemie in der El-Tor-Quarantänestation auf der Sinaihalbinsel festgestellt hatte. Jahre hindurch hatte man diesen Vibrio nicht zu den Cholera-vibrionen gezählt und die Krankheit, die er verursachte, Paracholera genannt. Später, in den Jahren 1947, 1962 und 1964, kam es zu Epidemien zuerst in Ägypten, dann in Hongkong, auf den Philippinen, in Thailand, Burma, Malaysia, Vietnam und Korea. Auch die letzten, zum Glück kleinen und sporadischen Epidemieausbrüche sind durch den Vibrio El-Tor verursacht worden [2].

Obwohl der Vibrio Cholerae schon vor 85 Jahren entdeckt wurde, blieb die Pathogenese der Cholera im dunkeln bis auf die letzte Dekade. Während *Koch* selbst die Folgen der Krankheit durch ein Vibrio-cholerae-Toxin vermutete, setzte sich für die kommenden Jahrzehnte der Glaube an die Endotoxine aus den Vibrionen als Krankheitsfaktor durch. Dazu veranlaßte der Umstand, daß die Vibrionen in dem normalerweise alkalischen Dünndarmmilieu sich zuerst anreichern, dann aber zerfallen und so ihre Giftstoffe freigeben. Die Folgen sind dann immer zahlreichere Durchfälle mit reißwasserähnlichen Darmentleerungen und Erbrechen. Die Durchfälle sind nicht schmerzhaft, führen aber rasch zu allgemeinem Wasser- und Mineralienverlust des Körpers, Durst und Trockenheit der Lippen und Schleimhäute. Es stellen sich Anurie und Wadenkrämpfe ein. Diese Symptome führen bekanntlich zu einem charakteristischen Gesichtsausdruck, während der Körper, weiter geschwächt, rasch an Gewicht einbüßt. Der Cholera-patient ist in einem bedauernswerten Zustand und jammert mit einer heiseren Stimme vor sich hin.

Seltsam ist für diese Krankheit, daß sie kein Fieber hervorruft, im Gegenteil, die Patienten leiden an Unterkühlung. Allgemeine Erschöpfung und Kreislaufkollaps führen in 40

bis 60 % zum Tode. Dies ist eine kurze Schilderung des Krankheitsbildes, das, so geprägt, seine Pathogenese sui generis haben muß, deren Aufklärung Jahrzehnte auf sich warten ließ.

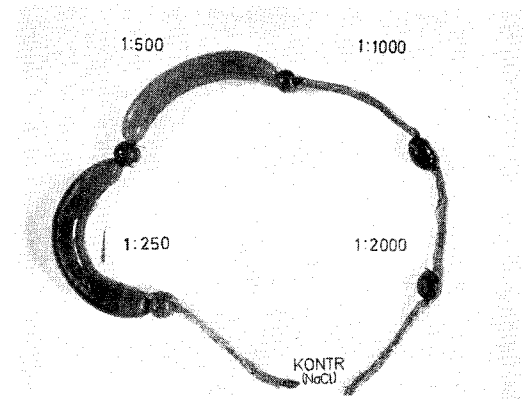
Dutta und *Habbu* gelang es 1955 [3] an etwa 16 Tage alten Kaninchen die intrainestinale Infektion mit Cholera-Vibrionen zu erzeugen, die dem klinischen Bild einer Cholera beim Menschen gleicht. Später gelang es *Dutta* und seinen Mitarbeitern [4, 5] zu zeigen, daß auch eine perorale Infektion wie auch ein Filtrat einer Cholerakultur zur selben Erscheinung führen. Auch die Filtrate der Cholera-Darmentleerungen enthielten dasselbe Agens. Erst mit diesen Befunden wurde es möglich, die Cholera experimentell zu erfassen.

Finkelstein und Mitarbeiter [6] stellten sehr dichte Cholererschüttelkulturen mit dem bisher toxischsten Stamm 569 B, Serotyp Inaba, das heißt sehr gut belüftete Kulturen her. Schon nach 12 Stunden wurde in den Kulturen der «choleraemic factor» festgestellt. Mit weiteren Beobachtungen der Kulturen und der Ausschüttung des choleraemic Faktors am Ende der logarithmischen Phase der Züchtung kam man zur Annahme, daß dieser Faktor ein Exotoxin ist, also kein Endotoxin als Folge der Autolyse der Cholera-Vibrionen in der Kultur. In weiteren Versuchen wurde dies von verschiedenen Autoren bestätigt [6, 8], und wir sprechen heute allgemein entweder von choleraemic Faktor (oder Faktoren) oder einfach von Cholera-toxin. Besonders hergestellte Nährböden, «Syncase», nach *Finkelstein* [9] und 3 % Bacto-Pepton-Dialysat bei pH 8 nach *Burrows* [10, 11] liefern heutzutage Cholera-toxine in den Mengen und Konzentrationen, die für das experimentelle Studium der immunologischen, biochemischen und pharmakodynamischen Eigenschaften angewendet werden können. In Studien, die in unserem Institut seit 1964 durchgeführt worden sind,

konnten wir die Angaben der Autoren bestätigen.

Wir sagten schon, daß eine der wichtigsten Bedingungen für die Toxinbildung in den Schüttelkulturen liegt, also in besser belüfteten Kulturen als dies die stationären sind. In den Fermentoren läßt sich die Belüftung noch besser steuern und das pH der Kulturen genau kontrollieren [12]. Als Stamm wurde der besagte 569 B genommen. Nach der abgelaufenen Wachstumszeit wurde die Kultur geerntet, zentrifugiert und steril filtriert [13]. Das so gewonnene Filtrat enthält ein sehr potentes und interessantes Rohtoxingemisch. Dieses ist vom Typ der Exotoxine, der Toxine, die aus der *Vibrio-coma*-Zelle aktiv ausgeschieden werden. Es besitzt verschiedene biologische und immunologische Eigenschaften, von denen wir zwecks besserer Übersicht nur die zwei gut definierbaren toxischen Eigenschaften beschreiben. Zuerst soll gesagt werden, daß diese im Roh-toxin sich befindenden Substanzen nicht dialysierbar sind, das heißt relativ große Moleküle sind, doch sehr thermolabil und schon bei 56 °C nach 15 Minuten inaktiviert werden. Die pathogenetisch interessante Substanz ist die sogenannte darmreaktive Substanz (in der Literatur als «loop-reactive substance» bezeichnet) oder Choleraagen, die für die typischen Veränderungen im Darm bei Choleraerkrankten verantwortlich ist. Zuerst läßt sich dies an der experimentellen Infektion von «Kaninchenbabies» sehen und dann bei operativen Eingriffen, wo man bei jungen Kaninchen am Dünndarm durch Unterbindung einige Schlingen macht, in die dann das Toxin in verschiedenen Verdünnungen eingespritzt wird. Nachher wird die Bauchhöhle zugenäht, am nächsten Tag das Tier getötet und die Darmschlingen herausgenommen. Jetzt kann man deutlich beobachten, ob und wie aktiv das eingespritzte Toxin war. Die Darmschlingen zeigen je nach der Verdünnung mehr oder weniger

durch oft blutige Flüssigkeitsansammlung gefüllte Schlingen (Abb. 1). Mit dieser Technik kann man, wie wir noch sehen werden, auch mit dem antitoxischen Serum spezifische Neutralisationsversuche machen.



Die zweite Eigenschaft des Cholera-Toxins ist der nach *Craig* genannte Permeabilitätsfaktor, der die Permeabilität der Kapillaren der Haut erhöht. Wenn man nämlich eine kleine Menge dieses Toxins intrakutan einspritzt, entsteht eine Quaddel, die bald zu einer Induration und Rötung führt [14]. Dies ist noch ersichtlicher, wenn man nach einiger Zeit z. B. das Pontamine Sky Blue intravenös verabreicht, das dann in die Quaddeln penetriert und diese intensiv blau färbt. Die dialysierbaren Substanzen aus dem Roh-toxin sind thermostabil und kleinstmolekular. Eine von ihnen enthält eine sogenannte «sodium-pump-inhibitor»-Substanz, die den Natriumiontransport im Gewebe hemmt, was sich besonders gut im Versuch an der Froschhaut zeigen läßt [15]. Die «loop-reactive substance» hat das meiste Interesse geweckt, weil diese Substanz als wichtigster Faktor in der Pathogenese der Krankheit angesehen werden muß. Diese Substanz stört die Funktion der Zellmembranen und so des Mineralienhaushaltes des

Darmgewebes, was die Anhäufung des Wassers und der Bikarbonate im Darmlumen zur Folge hat, bei zahlreichen Diarrhöen zur Dehydrierung des Körpers führt und nebst anderen toxischen Einflüssen das Leben des Patienten bedroht.

In der Folge der weiteren Versuche hat sich ergeben, daß das Choleragen antigene Eigenschaften besitzt. Dies haben wir in unserem Institut auch bestätigen können und auf Grund dessen ein sehr wirksames antitoxisches Pferdeserum hergestellt, das in gereinigtem Zustand für die kommenden klinischen Versuche bereit steht. Darüber hinaus dient es auch als Standard für die Choleratoxine.

Die antigene Eigenschaft des Choleratoxins führte auch zum Gedanken, es auch als möglichen Allein- oder Hauptfaktor eines kommenden Impfstoffes gegen Cholera zu verwenden. In unseren diesbezüglichen Versuchen haben wir einen Impfstoff in Form eines Cholera-Toxoid-Adsorbates zubereitet, das andeutet (die Versuche sind noch im Gange), daß man damit bei Menschen Antitoxine, Vibriocidine und Agglutinine im Blute gegen Cholera hervorrufen kann.

Die Choleraforschung ist in eine entscheidende Phase getreten. Viele Institute und zahlreiche Autoren bemühen sich, der Choleraerkrankung als pathogenetisches Geschehen auf die Spur zu kommen und so

alle Möglichkeiten zur Lösung der Frage der immunologischen Prophylaxe oder des klinischen Eingreifens beizusteuern.

Literatur:

- [1] Jugoslawische Medizinische Enzyklopädie, 5, (1961).
- [2] *Poltzer R.*: Cholera: WHO Monograph Ser. Nr. 43, Geneva 1954.
- [3] *Dutta N. K. und Habbu M. K.*: Brit. J. Pharmacol. 10, 373 (1955).
- [4] *Dutta N. K., Panse M. V. und Kulkarni D. R.*: J. Bact. 78, 594 (1959).
- [5] *Oza N. B. und Dutta N. K.*: J. Bact. 85, 497 (1963).
- [6] *Finkelstein R. A. und Norris H. T.*: Fed. Proc. 23, 114 (1964).
- [7] *De S. N. und Chatterje D. N.*: J. Path. Bact. 66, 559 (1953).
- [8] *De S. N., Ghose M. L. und Sen A.*: J. Path. Bact. 79, 373 (1960).
- [9] *Finkelstein R. A., Norris H. T. und Dutta N. K.*: J. Infect. Dis. 114, 203 (1964).
- [10] *Burrows W.*: Ann. Rev. Microbiol. 5, 181 (1951).
- [11] *Burrows W., Oza N. B. und Dutta N. K.*: J. Infect. Dis. 115, 1-8 (1965).
- [12] *Stanic M.*: Therap. Umschau, 20, 323 (1963).
- [13] *Ungar J., Chariatte M., Stanic M. und Varallyay S.*: Proceeding of the Internat. Congress of the Permanent Section of Microbiological Standardization, Prague.
- [14] *Craig J. P.*: Nature, 207, 614 (1965).
- [15] *Fuhrmann F. A., Fuhrmann G. J. und Burrows W.*: J. Infect. Dis. 111, 225 (1962).

Adresse des Autors:

M. Stanic, Schweiz. Serum- und Impfinstitut, Rehhagstraße 79, 3000 Bern.