XIX.

Aus dem Laboratorium der hydrotherapeutischen Anstalt der
Universität Berlin (Geh. Med.-Rath Prof. Dr. L. Brieger).

Ueber Versuche zur Immunisirung gegen Schweine- rothlauf.

Von

Oberstabsarzt z. D. Dr. R. Bassenge.

Die Verluste an Schweinen durch Rothlaufferkrankungen haben in den vergangenen 10 bis 12 Jahren dank der fast überall in Deutschland angewandten Schutzimpfungen immer mehr abgenommen. Nach unseren heutigen bakteriologischen Anschauungen könnte es durch planmässige Schutzimpfungen sämtlicher Schweine in einem bestimmten Bezirk gelingen, diese Seuche vollkommen auszutilgen, und dadurch weitere Schutzimpfungen überflüssig zu machen, falls nicht die Seuche von Neuem von ausserhalb in einen solchen Bezirk verschleppt wird.

Da in Deutschland seit Jahren der Schweinerothlauf in einem Maasse wie kaum in einem anderen Lande durch Schutzimpfungen bekämpft wird, sollte man daher meinen, dass allmählich die Schutzimpfungen ein Erlöschen der Seuche hervorbringen müssten, aber grade das Gegentheil ist der Fall. Ein Schweinebestand, der ein Mal der Impfung gegen Rothlauf unterzogen worden ist, muss alle Jahre wieder frisch durchgeimpft werden, um Rothlaufferkrankungen und -Verluste zu vermeiden.

Die Ursache hierfür liegt in der Art der Schutzimpfungen selbst. Die Schutzimpfungen nach Pasteur erst mit Injectionen von abgeschwächten und in gewissen Abständen folgenden vollvirulenten Culturen würden es erklärlich erscheinen lassen, dass in den damit behandelten Beständen die Seuche nicht erlöschen kann, weil einerseits der Impfschutz erfahrungsgemäss nicht über ein Jahr dauert, andererseits im Darm und im Koth der Schweine, auch in den Ställen selbst die Rothlaufbacillen sich lange genug lebens- und ansteckungsfähig erwiesen haben. Die Pasteur'sche Methode ist in Deutschland wenigstens ziemlich allgemein aufgegeben und an deren Stelle die Methode der Schutzimpfung nach Lorenz getreten. Während die Pasteur'sche Methode eine active Immunisirung bewirkt, ist die Lorenz'sche eine passiv-active (Simultan-) Immunisirung. Nach Lorenz werden die Schweine mit einer Rothlauf-Immunserum-Einspritzung passiv vorbehandelt; der passiven Immunisirung

folgt entweder unmittelbar darauf oder einige Tage später die active Immunisirung mittels lebender Rothlaufcultur¹⁾.

Das benutzte Immunserum wurde ursprünglich von rothlaufkranken Schweinen gewonnen, wird jetzt aber allgemein durch Behandlung von Pferden erzeugt, welche mit Rothlaufculturen in steigender Dosis behandelt werden. In zahlreichen Anstalten, wie in Prenzlau, Landsberg, Feuerbach, Mohrungen, Hamburg, Halle, Cöln, Thorn, Darmstadt u. a. werden Serum und Culturen fabrikmässig zum Versand hergestellt, und nicht nur an Thierärzte und landwirthschaftliche Verbände im Grossen, sondern auch an einzelne Schweinezüchter im Kleinen abgegeben. Meist wird gegenwärtig die Impfung gleichzeitig oder vielmehr unmittelbar nacheinander vorgenommen, indem an den zum Impfen geeigneten Stellen des Thierkörpers erst an der einen Seite das Immunserum und danach an der entsprechenden Stelle der anderen Seite des Thierkörpers die lebende Cultur in vorgeschriebener Dosis eingespritzt wird. Da das Immunserum einen Phenolzusatz enthält, welcher lebende Culturen abtödtet, muss mit 2 verschiedenen Spritzen gearbeitet, und es müssen für beide Injectionen verschiedene Stellen des Körpers gewählt werden, um nicht die Immunisirung illusorisch zu machen.

Auf die Gefahr der Rothlaufverbreitung durch diese Art der Immunisirung ist seiner Zeit besonders von Schütz und Voges hingewiesen worden, einer Ansicht, der von Lorenz aber widersprochen wurde, mit der Begründung, dass geimpfte Thiere immun seien und daher weder an Rothlauf erkranken noch eine Weiterinfection vermitteln könnten. Man muss aber, wie bei jeder Menschen- und Thierseuche, annehmen, dass es auch unter den Schweinen Individuen giebt, welche gegen eine Rothlaufinfection eine natürliche Immunität besitzen und bei einer Infectionsgelegenheit zwar mit Rothlaufbacillen inficirt werden, aber nicht an Rothlauf erkranken. Diese Thiere wirken dann als Bacillenträger in den inficirten oder durchgeimpften Beständen; in inficirt gewesenen Beständen werden sie nach Ablauf der — durch das Ueberstehen der Krankheit auf natürlichem Wege erworbenen — Immunität der Ausgangspunkt für Neuerkrankungen und in durchgeimpften Beständen bilden derartige Parasitenträger ebenfalls nach Ablauf der künstlichen, durch die Schutzimpfung erzielten Immunität eine neue Infectionsquelle. Eine Desinfection der Ställe nach der Durchimpfung oder nach dem Erlöschen der Seuche ist, wie die praktische Erfahrung gelehrt hat, ziemlich unwirksam. Thatsache ist jedenfalls, dass einmal geimpfte Bestände jedes Jahr wieder frisch immunisirt werden müssen, auch wenn sie von aussen her nicht der Gefahr der Neuinfectionen ausgesetzt sind, und dass die Unterlassung der jährlichen Nachimpfung regelmässig aus-

1) Schon lange vor Lorenz haben Brieger, Kitasato und Wassermann in Band XII der Zeitschrift für Hygiene (1892), S. 174 bekannt gegeben, dass sie Mäuse in ausserordentlich sicherer Weise durch die combinirte Vorbehandlung mit Thymus-Rothlauf-Bouillon und abgeschwächter lebender Cultur gegen Rothlauf immunisiren konnten. Die Methode trägt also ihren Namen, soweit man unter ihr eine derartige combinirte Vorbehandlung versteht, zu Unrecht.

gedehnte Neuerkrankungen und die damit verbundenen Verluste zur Folge hatte.

Die Lorenz'sche Impfmethode hat sich als ausreichender Schutz, unter der Voraussetzung, dass sie alljährlich wiederholt wird, derartig bewährt und eingebürgert, dass sie nicht wieder verdrängt werden kann, es sei dann, dass etwas Besseres, Vollkommneres an ihrer Stelle eingeführt wird, nämlich eine Methode, bei welcher die Nachimpfung mit lebenden Culturen in Fortfall kommt. In der Erkenntniss, dass die von ausgezeichneten Erfolgen begleitete Schutzimpfungsmethode nach Lorenz doch auch schwerwiegende Nachtheile — namentlich wenn die Impfung wie häufig durch Laien ausgeführt wird — in sich birgt, arbeiten seit Jahren zahlreiche Forscher an der Gewinnung eines Stoffes, welcher nicht nur heilende Eigenschaften besitzt, wie das von Schütz und Voges angegebene Präparat Susserin, sondern welcher auch einen genügenden prophylaktischen Schutzwert in den gefährdeten Beständen schafft, ohne dass man die Nachtheile einer activen Immunisirung mit lebenden Culturen mit in Kauf nehmen muss. Durch das Hantiren mit lebenden Rothlaufculturen werden auch Menschen gefährdet, welche bei leichten Hautverletzungen an erysipelähnlichen phlegmonösen Entzündungen erkranken können. Zwar verlaufen diese Erkrankungen in der Regel gutartig; es sind jedoch auch schwere Erkrankungen an Impfrothlauf bei Menschen vorgekommen, welche die Functionsfähigkeit eines Gliedes beeinträchtigt und sogar das menschliche Leben bedroht haben; es sollen Thierärzte an Impfinfectionen gestorben sein. Auch aus diesem Grunde ist die Beseitigung der Schutzimpfung mit lebenden Rothlaufculturen als erstrebenswerth zu erachten.

Die Entdeckung der Brieger-Mayer'schen Schütteltoxine für Typhus und Cholera liess es nicht aussichtslos erscheinen, dass mit dieser Methode auch aus Schweinerothlaufbacillen ein wirksamer Schutzstoff extrahirt werden könnte, besonders nachdem diese Methode durch den Verfasser dieser Arbeit bei Extraction von Typhusbacillen so beachtenswerthe Erfolge erzielt hatte, dass auch viele Forscher sich derselben ebenfalls zur Gewinnung von Schutz- und Impfstoffen aus anderen Bakterien, z. B. aus Dysenterie- und Schweineseuchebacillen, bedienten.

Das Princip der Brieger-Mayer'schen Schütteltoxingewinnung liegt darin, dass grössere Bakterienmengen ohne den Nährboden, auf welchem sie gewachsen sind, in destillirtem Wasser stunden- bis tagelang geschüttelt werden, um so aus den lebenden Bakterien die Schutzstoffe auf das Schonendste zu extrahiren. Während es für Typhus, Cholera und Dysenterie ungeheuer leicht ist, grosse Bakterienmengen auf Agarnährböden zu züchten, die dann mit destillirtem Wasser abgeschwemmt werden können, ist das für Rothlauf unmöglich. Der Rothlauf wächst auf Agar innerhalb 24 bis 48 Stunden in ganz feinen, durchscheinenden thautropfenähnlichen Colonien, deren Abschwemmen niemals eine genügende Ausbeute zur Behandlung nach der Schüttelmethode gäbe und die auch sehr schwer von dem festen Nährboden zu entfernen sind.

Man musste daher, um grössere Bacillenmengen zu gewinnen, diese

in flüssigen Medien, Bouillon, züchten; dann aber durfte auch die Bebrütung dieser Culturen nicht zu lange ausgedehnt werden, um eine partielle Autolyse von Bakterien und Uebergang von Schutzstoffen in das Nährmedium zu verhindern, da diese Schutzstoffe ja erst durch das Schütteln im destillirten Wasser extrahirt werden sollten. Als bestes Nährmittel erwies sich eine Rinderbouillon mit Zusatz von 2pCt. Pepton und 2pCt. gesättigter Sodalösung. Nach längstens 48stündiger Bebrütung bei 48° C. wurden die Kolben dem Brutschrank entnommen, die Bacillen durch Zusatz eines Rothlaufserums agglutinirt und nach mehrstündigem Absitzenlassen in der elektrischen Centrifuge scharf centrifugirt, so dass die Bouillon fast klar wurde. Diese wurde abgegossen, der Bakterienbrei mit destillirtem Wasser aufgenommen und 24 bis 48 Stunden ununterbrochen im Schüttelapparat geschüttelt. Danach wurden die Rothlaufbacillen im Pukallfilter abfiltrirt und das Filtrat als Impfstoff benutzt.

Das Filtrat stellte eine klare, hellgelbe Flüssigkeit dar, welche genügend toxische Eigenschaften zeigte; einer subcutanen Injection von 0,5 ccm erlagen weisse Mäuse in 3—5 Tagen. Trotzdem war der immunisatorische Werth dieser Substanz gering; 0,3 ccm derselben Mäusen subcutan beigebracht, vermochten diese gegen eine sofortige oder einige Tage später angewandte Einspritzung von 0,01 ccm Rothlaufcultur gar nicht oder nur wenig zu schützen. Die Versuchsthiere erlagen theils gleichzeitig, theils ein bis zwei Tage später, als die Controllthiere der Rothlaufinfection.

Dieser Misserfolg konnte seine Ursache darin haben, dass die Zellmembranen der Rothlaufbacillen während der Ausschüttelung ein Austreten von Endotoxinen in die umgebende Flüssigkeit verhinderten oder darin, dass die wirksamen Substanzen schon grösstentheils während der Bebrütung in das Nährmedium übergegangen waren.

Im ersteren Falle musste versucht werden, die Zellmembranen durch ein chemisches Agens zu zerstören oder durchgängig zu machen, im zweiten die wirksamen Stoffe aus dem Nährmedium zu gewinnen.

Zunächst wurden Versuche in der Richtung angestellt, auf die Zellmembranen selbst einzuwirken und zwar wurden die Rothlaufbacillen der Einwirkung von Petroläther ausgesetzt. Das Verfahren gestaltete sich bis zur Beendigung des Centrifugirens genau so wie oben beschrieben. Danach wurden die Bakteriensedimente aus den Centrifugengefässen mit Petroläther aufgenommen und in diesem 24 bis 48 Stunden ununterbrochen geschüttelt. Nach der Ausschüttelung wurde die ganze Menge in graduirte Glasylinder gebracht; danach setzte sich binnen wenigen Stunden ein voluminöser, dickflüssiger, weisslicher Bakterienbrei ab, über welchem sich eine noch ziemlich stark getrübe hohe Schicht von Petroläther befand. Diese beiden Schichten wurden durch Abgiessen voneinander getrennt, die obere Schicht (PO) im Exsiccator verdampft und dessen trockener Rückstand je nach der Menge mit einigen Cubikcentimetern sterilen destillirten Wassers aufgenommen. Die untere Schicht (PR) wurde durch Zusatz von sterilem destillirtem Wasser verdünnt und danach

24 bis 48 Stunden der Ausschüttelung unterworfen, während welcher die in ihr enthaltenen Reste im Petroläther verdampften.

Mit den beiden Substanzen, PO und PR, wurden Versuche an weissen Mäusen angestellt. Es zeigte sich, dass subcutane Dosen von 0,5 cem keine toxischen Wirkungen auf diese Thiere ausübten. PO hatte in der gleichen Dosis nicht den geringsten immunisatorischen Effect, während PR eine gute immunisatorische Wirkung zeigte.

Die mit 0,4 und 0,6 cem PR vorbehandelten Mäuse ertrugen noch nach 16 Tagen eine Injection von 0,01 cem lebender Rothlaufcultur ohne irgend eine Störung der Gesundheit, welcher die Controlthiere innerhalb 3 Tagen erlagen.

Die Gewinnung dieses Schutzstoffes erschien aber für praktische Versuche im Grossen zu umständlich und es wurde nun die Extraction von Schutzstoffen durch einen chemisch indifferenten Körper versucht; hierzu diente eine 10 proc. Glycerinlösung, welche sich bei der Extraction von Schutzstoffen aus Typhusbacillen bewährt hatte. Nach den oben beschriebenen Verfahren wurden die centrifugirten Rothlaufbacillenmassen aus den Centrifugengefässen mit 10 proc. Glycerinlösung aufgenommen und so in den Schüttelapparat gebracht. Nach der Ausschüttelung waren die in der Schüttelflüssigkeit enthaltenen Rothlaufbacillen noch vollkommen intact und lebensfähig, wie zu erwarten war. Da durch Filtriren im Pukallfilter in der glycerinhaltigen Suspension auch leicht die Schutzstoffe hätten zurückgehalten werden können, wurde auf eine Filtration verzichtet und die Rothlaufbacillen wurden in der Suspension durch ein zweistündiges Verweilen im Thermostaten von 56° abgetödtet.

Der auf diese Weise gewonnene Schutzstoff hatte wenig toxische, aber auch nur schwach immunisatorische Eigenschaften auf Mäuse. Die in Dosen von 0,6 bis 1,0 cem vorbehandelten Thiere überlebten nach Injection von 0,01 cem lebender Rothlaufcultur die Controlthiere um 2—3 Tage. Bei Vorbehandlung mit geringeren Dosen als 0,6 cem verhielten sich Versuchsthiere und Controlthiere gleich.

Da die Ausschüttelung der Bakterien auf diese Weise nicht zum Ziele führte, vielleicht weil doch innerhalb 48 Stunden auch in flüssigen Nährmedien das Bacillenwachsthum nicht reichlich genug war, um genügende Toxinmengen aus ihnen extrahiren zu können, wurden die Versuche in der Weise fortgesetzt, dass die Rothlaufbouillonkolben längere Zeit bis 7 Wochen bei 37° C. bebrütet wurden. Drei mit Rothlauf geimpfte Bouillonkolben wurden 5 Wochen im Brutschrank von 37° C. aufbewahrt und zeigten innerhalb und nach dieser Zeit noch reichliche Fortpflanzungsfähigkeit¹⁾. Nach dieser Zeit wurden die Rothlaufbacillen wie bei den früheren Versuchen mit Rothlaufserum agglutinirt, centrifugirt, in destillirtem Wasser die Bacillensedimente abgeschwemmt und 24 Stunden dem Schüttelapparat übergeben. Eine Autolyse hatte nicht

1) Die Rothlaufstämme verhalten sich bei längerer Züchtung im Brutschrank verschieden. Einzelne bleiben bei Weiterzüchtung in frischer Bouillon fortpflanzungsfähig, andere sterben schon nach ein bis zwei Wochen im Brutschrank ab.

stattgefunden; die von Bacillen befreite Bouillon hatte weder toxische noch immunisatorische Eigenschaften. Die so von den drei Kolben gewonnenen Substanzen wurden auf verschiedene Art weiterbehandelt. Nummer I wurde durch Filtration im Pukallfilter von den Bakterien befreit; die Bacillenaufschwemmungen von Kolben II wurden im Thermostaten bei 57° innerhalb drei Stunden und die von Kolben III im Wasserbad bei 60° in 15 Minuten abgetödtet. Nummer I stellte eine hellgelbe, klare, bakterienfreie Flüssigkeit dar, Nummer II und III waren leicht getrübte sterile Bakterienaufschwemmungen. Keine der drei Flüssigkeiten zeigte stärkere toxische Eigenschaften, die mit subcutanen Dosen bis 2 ccm behandelten Mäuse blieben gesund. Mit subcutanen Einspritzungen von 0,9 bis 1,0 ccm aller dieser Flüssigkeiten konnten Mäuse gegen nachfolgende Einspritzung von lebender Rothlaufcultur ohne alle Krankheiterscheinungen sicher immunisirt werden, während die Controllthiere innerhalb 2—3 Tage verendeten. Die vorbehandelten Thiere blieben dauernd gesund. Die Vorbehandlung schützte die Thiere, auch wenn 14 Tage bis 3 Wochen nach derselben verstrichen waren.

Die Erwägung, dass die Gewinnung des so bereiteten Impfstoffes einerseits noch zu umständlich, andererseits auch zu kostspielig ist, verhinderte, Versuche an Ferkeln anzustellen. Die Kosten der Immunisirung eines Ferkels von 6—8 Wochen würde mit diesem Impfstoff ungefähr das Zehnfache einer Schutzimpfung nach Lorenz'scher Methode betragen. Allerdings liessen sich die Kosten bei fabrikmässiger Herstellung des Impfstoffes im Grossen noch herabsetzen. Jedenfalls beweisen diese Versuche, dass die Hoffnung der Herstellung eines Schutzstoffes gegen Schweinerothlauf unter Verzicht auf die Nachbehandlung mit lebenden Culturen nicht aussichtslos ist und dass sich irgend eine Methode der Schutzstoffgewinnung aus Rothlaufbakterien mit Hülfe der Brieger-Mayer'schen Ausschüttelung wird ausbilden lassen. In neuester Zeit hat die von mir entdeckte bakteriolytische Eigenschaft des Lecithins für Typhusbacillen die Anregung gegeben, auch die Wirksamkeit des Lecithins auf Rothlaufbacillen zu prüfen. Diese Versuche haben schon jetzt practisch brauchbare Resultate ergeben und es soll über diese in einer weiteren Arbeit berichtet werden.

Alle diese Versuche wurden im Laboratorium meines hochverehrten Lehrers, unseres heutigen Jubilars, auf seine Anregung und nach seinen Rathschlägen ausgeführt. Es war mir eine angenehme und ehrenvolle Dankespflicht, an dieser Stelle über meine Untersuchungen berichten zu dürfen.