Aus den Lungenheilstätten bei Beelitz.

Eine neue Methode zur Prüfung der Tuberkulinimmunität.

Vorläufige Mitteilung.

Von Dr. M. Pickert und Dr. E. Löwenstein.

Zur Prüfung der Immunität gegen Tuberkulin stehen uns bisher zwei Hauptwege zur Verfügung: einmal die direkte Prüfung der aktiven Immunität durch abgestufte Injektionen von Tuberkulin, dann die Prüfung des Serums auf seinen Antikörpergehalt.

Von Antikörpern, welche im Laufe der Immunisierung durch Tuberkulin auftreten, sind bisher bekannt: 1. die Agglutinine, von denen wir jedoch mit Sicherheit wissen, daß sie zur Bestimmung der Immunität nicht brauchbar sind; 2. die bakteriotropen Substanzen (Opsonine). Gegen diese jetzt so beliebte Methode wird der Einwand erhoben, daß die Bestimmung der die Phagocytose befördernden Substanzen im Blute erst dann einen Wert besitzt, wenn wir über die klinische Bedeutung der Phagocytose im tuberkulösen Herde orientiert sind. Aber selbst dann noch wird dieser Methode nur ein beschränkter Wert zuzuerkennen sein, da die Phagocytose in vitro unendlich viel leichter zustande kommt als in vivo. Es sei hier auf Metschnikoff selbst hingewiesen: „Es ist Tatsache, daß sich die Leukocyten in vitro anders verhalten können als im lebenden Organismus. Wir haben oft gesehen, daß in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Leukocyten der Meerschweinchen massenhaft die virulentesten, aus dem Blute stammenden Milzbrandbazillen aufnahmen, während im Meerschweinchenkörper keine Spur von Phagocytose zu finden war.“ Daß bei der Tuberkulose die Verhältnisse ganz ähnlich liegen, ist ja jetzt eine anerkannte Tatsache.

Schließlich verdient ein besonderes Interesse die Prüfung des Serums auf die komplementbindenden Stoffe. Wassermann und Kolle haben diese Methode für die Auswertung ihres Meningococcenserums mit Erfolg verwendet. Die Heranziehung dieses Verfahrens zur Bestimmung der Tuberkulinimmunität ist in letzter Zeit erfolgt. Bauer und Engel haben konstatiert, daß das Verschwinden des Komplements schon bei sehr geringen Tuberkulindosen auftrat, falls ein hochwertiges Serum verwendet wurde.

Alle diese Methoden sind Reagenzglasmethoden; man kann sie im besten Falle als indirekte Methoden bezeichnen. Als eine ideal-direkte Methode kann nur die angesehen werden, bei welcher die Höhe der erreichten Immunität direkt an ihrer Einwirkung auf die toxischen Substanzen bestimmt werden kann.

Durch die schöne Entdeckung v. Pirquets sind wir in den Stand gesetzt, die Wirkung des Tuberkulins auf die Haut direkt mit dem Auge zu verfolgen. Es lag daher nahe, diese neue Toxizitätsprüfung des Tuberkulins in das Bereich unserer Untersuchungen über Tuberkulinimmunität einzubeziehen.

Einleitende Untersuchungen bestätigten uns, daß die Wirkung des Tuberkulins auf die Haut wirklich durch die spezifische Komponente des Tuberkulins hervorgerufen wird: eine 4%ige Glyzerinbouillon, welche auf die Konzentration des Tuberkulins eingeeengt worden war, erwies sich bei einer Prüfung an 16 tuberkulösen Individuen als absolut eindeutig wirkungslos. Ferner sei hier erwähnt, daß die Hauptimpfung sowohl mit Menschen- als mit artfremden Seren keine Hautreaktion hervorruft.

Zunächst schien es wichtig festzustellen, ob im Blute von mit Tuberkulin immunisierten Menschen Stoffe auftreten, welche

die spezifische Wirkung des Tuberkulins auf die Haut tuberkulöser Individuen neutralisieren können.

Für die Auswertung des Serums wurde folgende Technik eingehalten:

Patienten, welche eine Injektion von mindestens 100 mg Alt-tuberkulin ohne Reaktion vertragen hatten, wurde stets mindestens 14 Tage nach der letzten Injektion durch Venaepunctio eine genügende Menge Blut entzogen. Das Serum wurde dann etwa 4 Stunden nach der Entnahme des Blutes mit fallenden Mengen von Tuberkulin versetzt, worauf das Gemisch für 1–1½ Stunden in den Brutschrank kam. In der Regel wurde es dann bald verimpft.

Unsere späteren Versuche ergaben jedoch, daß anscheinend die Bindung eine festere wird, wenn der Zeitraum zwischen Mischung und Verimpfung auf 24 Stunden ausgedehnt wird.

Da eine Hautreaktion erst nach verhältnismäßig starker Tuberkulinkonzentration auftritt, so stand zu befürchten, daß eine schützende Wirkung des Serums überhaupt nicht in Erscheinung treten würde, zumal ja die für therapeutische Zwecke nötigen Tuberkulinmengen in keinem Verhältnisse stehen zu den Mengen von Antigen, welche zur Erzeugung von Antitoxinen (Diphtherie, Tetanus) notwendig sind. Es war deshalb von Bedeutung für unsere Versuche, die geringste Tuberkulinkonzentration ausfindig zu machen, bei der in der Mehrzahl der Fälle noch auf den Eintritt einer Hautreaktion mit Sicherheit gerechnet werden kann. Schließlich hat sich eine 5%ige Tuberkulinkonzentration am zweckmäßigsten erwiesen. Es wurden aber in der Regel daneben auch 20%ige und 50%ige Tuberkulin-Serummischungen angewandt.

Bei der Austitrierung des Serums wurde stets so vorgegangen, daß Normalserum und Serum des spezifisch Behandelten — das wir der Einfachheit halber spezifisches Serum nennen wollen — unter genau den gleichen Bedingungen entnommen, behandelt und nebeneinander an demselben Arm an ein und demselben Menschen verimpft wurde.

Wir wählten zur Kontrolle eine derartige Tuberkulin-Normalserummischung, um den Versuch völlig einwandfrei zu gestalten, trotzdem sich bei den zahlreichen Vorversuchen ergeben hatte, daß durch Verimpfung eines Tuberkulin-Normalserumgemisches und einer gleichprozentigen einfachen Tuberkulinlösung bei derselben Person erkennbare Unterschiede in der Reaktion nicht entstehen.

Von den Ergebnissen unserer Vorversuche mag noch die wohl nicht uninteressante Tatsache erwähnt sein, daß das Serum von Patienten, die mit hohen Dosen von Bazillenemulsion behandelt waren, deutlich, aber erheblich schwächer als das Serum der mit Alttuberkulin Behandelten die Hautreaktion beeinflusste.

Als Beispiele möchten wir drei Versuchsreihen anführen: die Fälle B., H. und W., alle drei offene Tuberkulosen im zweiten Stadium, reichlich Tuberkelbazillen im Auswurf. B. hatte im ganzen 376,7 mg Tuberkulin mit 15 Injektionen erhalten, H. 585,9 mg Tuberkulin mit 18 Spritzen, W. 1102 mg Tuberkulin mit 18 Spritzen. Die letzte Injektion betrug bei B. 100 mg Tuberkulin, bei H. 150 mg Tuberkulin, bei W. 300 mg Tuberkulin.

Dem spezifischen Serum und dem Normalserum wurde dann Tuberkulin zugesetzt, und zwar im Verhältnis von

1.	0,05 Tuberkulin zu 0,95 Serum
2.	0,1 " " 0,4 "
3.	0,2 " " 0,2 "

Darauf Unterbringung der Tuberkulin-Serumgemische für 1 bis 1½ Stunden im Brutschrank, dann Impfung, teils sofort, teils nach 24 Stunden, teils noch später, und zwar stets in der Weise, daß jeder Patient einen abgeschlossenen Versuch repräsentierte, indem stets die gleiche Konzentration des Normalserums und des spezifischen Serums nebeneinander an demselben Arm verimpft wurde.

Aus den Impfungen mit 20- und 50%igen Tuberkulinkonzentrationen ergaben sich nicht Resultate, welche einwandfrei eine Einwirkung des spezifischen Serums auf das Tuberkulin erkennen ließen. Wir beschränken uns deshalb auf die Wiedergabe der Fälle, welche mit 5%igem Tuberkulinserum geimpft wurden. Von den geimpften Patienten reagierten vier überhaupt nicht, weder auf das spezifische Serum-Tuberkulin-gemisch noch auf die Normalserum-Tuberkulinmischung. Diese Fälle scheiden deshalb aus, die übrigen 104 Versuche haben dagegen ein verwendbares Resultat ergeben.

Zur besseren Uebersichtlichkeit empfiehlt es sich, die bei

diesen 104 Versuchen gewonnenen Resultate in folgende Kategorien einzuteilen:

1. Die Fälle, bei denen eine völlige Aufhebung der charakteristischen Tuberkulinwirkung auf die Haut konstatiert wurde, während die an dem gleichen Arm ausgeführte Kontrollimpfung mit dem gleichprozentigen Tuberkulin-Normalserumgemisch positiv ausfiel;

2. die Fälle, bei denen eine sehr wesentliche abschwächende Beeinflussung auf die Hautreaktion gegenüber der Kontrollimpfung eintrat;

3. die Fälle, bei denen diese Beeinflussung schwächer, aber trotzdem noch zweifellos war;

4. die Fälle, die auf beide Tuberkulin-Serumgemische in gleicher Weise reagierten;

5. die Fälle, bei denen die Reaktion auf die Impfung mit dem spezifischen Serumgemisch die stärkere war.

Dann ergibt sich folgende Tabelle:

	I	II	III	IV	V	zusammen
B.	19	8	7	2	0	36
H.	7	9	9	10	1	36
W.	9	9	9	5	0	32
	35	26	25	17	1	104

Aus dieser Zusammenstellung geht ohne weiteres hervor, daß das spezifische Serum eine die spezifische Hautwirkung des Tuberkulins neutralisierende Eigenschaft besitzt. Bei dem einzigen Falle, der dem zu widersprechen scheint, handelte es sich um einen Menschen mit hochgradiger Hautempfindlichkeit, dem Phänomen der Dermographie und Ähnlichem, bei dem infolge der Impfung eine sonst von uns nie beobachtete starke Schwellung und Rötung der ganzen Haut des Oberarms auftrat. Wir glauben berechtigt zu sein, diesem vereinzelt dastehenden Impfergebnis keinen besonderen Wert beimessen zu müssen.

Um die Bewertung der Sera unserer Patienten analog der Wertbestimmung der Diphtherie- und Tetanussera auszugestalten, bemühten wir uns, ein Standardserum von Kaninchen zu gewinnen. Gesunde Kaninchen erhielten in Zwischenräumen von etwa 14 Tagen 2—7 ccm Tuberkulin subkutan bzw. intravenös injiziert. Auch bei dem Kaninchen, welches im ganzen 11 ccm subkutan erhalten hatte und 14 Tage nach der letzten Injektion entblutet war, ließ sich auch nicht die geringste Tuberkulin neutralisierende Wirkung nachweisen, eine Tatsache, auf welche wir bei anderer Gelegenheit zurückkommen werden.

Aus unseren bisherigen Versuchen ergaben sich zunächst als **Schlußfolgerungen**: Das normale Serum hat keine Tuberkulin neutralisierenden Fähigkeiten. Das Serum von tuberkulösen Individuen, welche eine Immunität gegen höhere Dosen von Tuberkulin und auch von Bazillenemulsion erlangt haben vermag die spezifische Wirkung des Tuberkulins auf die Haut tuberkulöser aufzuheben bzw. abzuschwächen.

Die Wertigkeit des spezifischen Serums geht nicht parallel der Quantität des injizierten Tuberkulins; es scheint hier ein drittes Moment in Frage zu kommen. Wir müssen es nach unseren Versuchen als sehr wahrscheinlich ansehen, daß im Verlaufe der Immunisierung mit Tuberkulin bei klinisch relativ günstig zu beurteilenden Fällen diese neutralisierenden Fähigkeiten früher und kräftiger in Erscheinung treten, als dies bei den klinisch weniger günstig zu beurteilenden Fällen der Fall ist. Die Frage, ob bei dem natürlichen Heilungsprozesse der Tuberkulose die durch die gleiche Methode nachweisbaren Antikörper entstehen, können wir noch nicht definitiv entscheiden, da wir erst über zwei derartige Fälle mit positivem Ergebnis verfügen.

Ein und demselben Gemisch von Tuberkulin und spezifischem Serum gegenüber verhält sich zwar dasselbe Individuum vollkommen gleichmäßig; jedoch scheint die Neutralisationsgrenze für verschiedene Individuen eine verschiedene zu sein. Ein Gemisch, das von dem einen tuberkulösen Individuum als neutral empfunden wird, kann bei einem anderen noch eine Reaktion hervorrufen. Diese Beobachtung findet auch in der Immunitätslehre ihre Analogie. Schon Behring, Buchner

und Knorr hatten beobachtet, daß Tetanus-Antitoxinmischungen, die für Mäuse unschädlich waren, bei Meerschweinchen noch Tetanus erzeugten. Kretz hat beschrieben, daß Diphtherie-Toxin-Antitoxinmischungen, welche beim normalen Pferde keinerlei Reaktion hervorrufen, bei immunisierten Tieren zur Antitoxinproduktion anregen. In derselben Weise variiert sicher auch beim Menschen die Empfindlichkeitsbreite gegenüber den Tuberkulin-Serummischungen. Deshalb wird man auch gegen den naheliegenden Gedanken, die subkutane Injektion des Gemisches statt der kutanen Impfung zur Austitrierung zu verwenden, mit noch mehr Recht einwenden müssen, daß angesichts der enormen Schwankung in der Empfindlichkeitsbreite und der soviel stärkeren Wirkung der subkutanen Impfung dieser Prüfungsmodus keine so verlässlichen Resultate liefern könnte.

Weitere Versuche werden erst ergeben, ob der Ausbau dieser Methode sich für die Tuberkuloseforschung fruchtbar erweisen wird.