Aus dem Serotherapeutischen Institut der Klinischen Hochschule in Mailand. (Direktor: Prof. Dr. S. Belfanti.)

Ueber die Meiostragminreaktion bei der Maul- und Klauenseuche.

Von Priv.-Doz. Dr. Alberto Ascoli.

Die Bekämpfung der Maul- und Klauenseuche bildet eine der schwierigsten Aufgaben der Veterinärpolizei, deren Lösung trotz der jahrelangen Untersuchungen hervorragender Forscher, die im Kampfe gegen andere Infektionskrankheiten zu dem Siege verhalfen, noch aussteht.

Alle Bemühungen, den Krankheitserreger bei der Maul- und Klauenseuche rein zu züchten, sind gescheitert, sodaß die Immunisierungsversuche und die künstliche Ansteckung mit natürlichem Virus verseuchter Tiere angestellt werden müssen, wodurch solche Versuche nicht unwesentlich erschwert werden. Noch größere Schwierigkeiten erwachsen jedoch der experimentellen Forschung aus der Unempfänglichkeit der gewöhnlichen Laboratoriumstiere für das Virus, welches sich bisher in keiner Weise auf Meerschweinchen und Kaninchen übertragen ließ, sondern bloß aus wirtschaftlichen Gründen beschränkte Experimentieren an Rindern und Schweinen gestattet.

Das langsame Tempo, in dem die Lösung der für die Prophylaxe maßgebenden Immunitätsprobleme erfolgte, und die Unfälle, welche bei den Impfversuchen sich ereigneten, sind in letzter Instanz wohl darauf zurückzuführen, daß den Forschungen bei der Maul- und Klauenseuche die für solche Studien unentbehrlichen reichlichen Kontrollproben fehlen mußten. Ist ja doch die Frage nach Vorkommen und Dauer der Immunität bei der Seuche noch immer offen und die Verwendung ungenügend abgeschwächten Impfmateri als nicht zu verhüten gewesen.

Zur Klärung solcher Streitfragen dürfte die Anwendung jener serodiagnostischen Methoden beitragen, welche den Nachweis von Antikörpern und Antigenen in vitro auf Grund der physikalisch-chemischen Erscheinungen, als Niederschlagsbildung, Komplementbindung oder Veränderungen in der Oberflächenspannung zu führen gestatten. Dergleichen Untersuchungen, zu welchen es als Ausgangsmaterial bloß des Blutserums der in Betracht kommenden Tiere und des natürlichen Virus bedarf, können selbstverständlich die Experimente am lebenden Tiere nicht ersetzen, welche allein die endgültige Entscheidung über organische Widerstandsfähigkeit und Wesen des Virus herbeizuführen vermögen; immerhin wäre beim positiven Ausfalle der Versuche wegen der Möglichkeit, sie in größerem Maßstabe auszuführen, ein nicht zu unterschätzendes Mittel zur vorläufigen Orientierung auf dem schwierigen Gebiete geboten.

Unter den Reaktionen, die serumdiagnostische Verwendung finden, gaben uns jedoch weder die biologische Präzipitinreaktion noch die Komplementbindung, welche letztere bei Vermischung des spezifischen Serums gegen Maul- und Klauenseuche mit filtriertem Virus positiv ausgefallen sein soll (Lourens), in unseren Vorversuchen hinreichend beweiskräftige Resultate. Von der Verwendung der neuen, von M. Ascoli entdeckten physikalisch-chemischen Immunitätsreaktion erzielten wir hingegen schon bei den ersten Versuchen geringe, aber konstante Unterschiede zwischen dem Verhalten des normalen Rinderserums und jenem der verseuchten oder immunisierten Tiere, sodaß wir zur weiteren Ausbildung des Verfahrens veranlaßt wurden und dessen differentiell-diagnostischen Wert in überzeugender Weise feststellen konnten.

Diese neue physikalisch-chemische Immunitätsreaktion beruht auf den Veränderungen der Oberflächenspannung, die in den flüssigen Medien bei Zusammentreffen von Antikörpern und Antigenen stattfinden. So bilden sich beim Zusammenbringen von Typhusbazillenextrakten mit dem Serum Typhuskranker in bestimmten Verhältnissen schon nach zweistündigem Verweilen im Brutschrank bei 37°, wie M. Ascoli nachweisen konnte, leichter diffusible Produkte, die eine Herabsetzung der Oberflächenspannung bedingen, sodaß die einzelnen Tropfen kleiner werden resp. die Anzahl der von demselben Volumen der Flüssigkeit abfließenden Tropfen wächst.

Die Meiostragminreaktion (von *μείων* kleiner und *στέγμα* Tropfen, d. h. der kleineren Tropfen) wurde kurz nach ihrer Entdeckung von Izar zum Nachweis von Antikörpern bei Syphilis, bei der Tuberkulose, bei der Echinokokkose und Anchylostomiasis in analoger Weise wie die anderen bekannten serodiagnostischen Methoden verwendet. Aus den Untersuchungen über die Meiostragminreaktion bei Typhus geht hervor, daß diese mit den Ergebnissen der Widalschen Probe übereinstimmende Resultate liefert, die mindestens ebenso spezifisch wie jene zu sein scheinen, weil die Zunahme der Tropfenzahl bloß dann beobachtet wird, wenn das Typhusserum mit Typhusbazillenextrakten zusammengebracht wird, hingegen ausbleibt, wenn anstatt dessen Paratyphus A und B-Extrakte herangezogen werden. Die vielfältigen serodiagnostischen Anwendungen, welche die neue Reaktion in kurzer Zeit fand, sprechen einerseits für ihren generellen Charakter, gestatten anderseits auch ein Urteil über ihre praktische Tragweite und theoretische Bedeutung. Sera von Syphilitikern geben mit echtem syphilitischen Antigen positive Reaktion, diese fällt hingegen bei Ersatz der Leberextrakte von syphilitischen Foeten durch das bei der Wassermannschen Reaktion vielfach verwendete Meerschweinchen-Herzmuskel-extrakt negativ aus; außerdem scheint bei Syphilis die Meiostragminreaktion spezifischer zu sein als die Wassermannsche Probe, weil die Zunahme der Tropfenzahl mit Serum von Leprakranken, bei denen jene positiv auszufallen pflegt, nicht stattfindet. Bei der Tuberkulose dürfte der positive Ausfall der Meiostragminreaktion einen floriden spezifischen Prozeß anzeigen, im Gegensatz zu den anaphylaktischen Reaktionen, die wegen ihrer großen Empfindlichkeit auch bei erloschenen Herden positiv sein können. Zu der vielumstrittenen Frage nach der Spezifität der verschiedenen Arten der Tuberkelbazillen liefern die Untersuchungen von Gasbarrini einen interessanten Beitrag, insofern er in der Meiostragminreaktion ein neues differentiell-diagnostisches Mittel zur Unterscheidung des Typus humanus vom Typus bovinus und aviarius fand. Einen weiteren Wirkungskreis, und zwar den wichtigsten, fand die Meiostragminreaktion bei der Diagnose bösartiger Geschwülste, da sie den ersten serodiagnostischen Anhaltspunkt für einen Krankheitsprozeß liefert, bei dem die Komplementablenkungsmethode, die anaphylaktische Reaktion und die Bestimmung des antitryptischen Vermögens wegen der Vieldeutigkeit und Unregelmäßigkeit der erhobenen Befunde keinen klinischen Wert beanspruchen können. Die ersten Untersuchungen von M. Ascoli und Izar, durch welche eine konstante spezifische Zunahme

der Tropfenzahl beim Zusammenbringen von Serum an bösartigen Geschwülsten leidender Individuen, resp. mit experimentellem Sarkom behafteter Ratten, mit Tumorextrakten von Menschen oder Ratten nachgewiesen wurde, sind in der Tat von seiten mehrerer Forscher bestätigt worden, sodaß die biologische Diagnose der bösartigen Geschwülste als ein neuer Erfolg der Serumdiagnose betrachtet werden darf.

In Anbetracht der interessanten Ergebnisse, welche die Meiostragminreaktion bei ihrer Anwendung auf medizinische und biologische Probleme zutage gefördert hat, schien es gerechtfertigt, den Versuch einer Uebertragung der neuen Methode auf tierärztliche Streitfragen anzustellen, um so mehr, als gerade auf diesem Gebiete ein großes, vielversprechendes Arbeitsfeld vorliegt. In dieser Abhandlung berichte ich über die Resultate, welche bei der Maul- und Klauenseuche erzielt wurden.

Das zu meinen Untersuchungen nötige Ausgangsmaterial, nämlich Virus in Form von frischen Bläschenmembranen samt Inhalt und teilweise in Gestalt von mehr oder weniger gut erhaltenen Schleimhautfetzen und Sera erkrankter Tiere, konnte von mir dank dem Entgegenkommen des hiesigen Kreistierarztes Dr. Fracassi und der Gemeindetierärzte Dr. Galbusera und Dr. Casari in verseuchten Beständen der Provinz Mailand gesammelt werden; denselben Tieren konnte ich nach Hebung der Sperre neue Serumproben entnehmen und in einem Falle eine Kuh zur Ader lassen, die, selbst immun, im Verdacht stand, die Seuche in den Bestand verschleppt zu haben, weil die Seuche kurz nach ihrer Ueberführung aus einem vor einigen Monaten verseucht gewesenem Stalle ausgebrochen war. Zur Kontrolle dienten teils vor der Impfung entnommene Sera von jungen Kühen, die in unserem Institute zur Lymphgewinnung verwendet und bei der Schlachtung gesund befunden wurden, teils im Schlachthause gesammelte Sera gesunder oder mit anderen Krankheitsprozessen behafteter Tiere. Die Darstellung des Antigens erfolgte anlehnend an die Methoden, nach welchen von M. Ascoli-Izar schon beim Typhus bei bösartigen Geschwülsten, bei Echinokokkose etc., gute Resultate erzielt worden waren. Die besten Resultate lieferte mir das mittels Alkohol und Aetherextraktion der erkrankten Mundschleimhaut gewonnene Antigen in alkoholischer Lösung. Nähere Angaben darüber finden sich in der ausführlichen Mitteilung, die demnächst in der Zeitschrift für Infektionskrankheiten, parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere erscheint.

Bei der Ausführung der Reaktion selbst befolgte ich genau die Methodik, welche ich im Laboratorium für spezielle medizinische Pathologie in Pavia, der Wiege dieses neuen serodiagnostischen Verfahrens, erlernt hatte. Die verschiedenen Sera wurden stets mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von 1 : 20 verdünnt; zu je neun in Reagenzröhrchen verteilten Kubikzentimetern der Lösung wurde einerseits 1 cm ebenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von 1 : 50—75 verdünnten Antigens, andererseits einfach 1 cm physiologischer Kochsalzlösung allein hinzugefügt. Die Reagenzröhrchen wurden nach dem Schütteln eine Stunde lang in ein auf 50° eingestelltes Wasserbad gebracht; sobald sie auf Zimmertemperatur abgekühlt waren, wurde die in einem bestimmten Volumen enthaltene Tropfenzahl mittels des Traubeschen mit H₂O ungefähr 56 Tropfen liefernden Stalagmometers bestimmt. Der Unterschied in der Tropfenzahl der beiden Proben zeigt an, ob eine spezifische, durch das Zusammentreffen von Antikörper und Antigen hervorgerufene Abnahme der Oberflächenspannung stattgefunden hat.

Um den einzelnen Proben eine über jeden Zweifel stehende Beweiskraft zu sichern, wurden bei jeder Versuchsreihe zwei Kontrollproben aufgestellt, die eine mit dem Serum einer bei der Schlachtung gesund gefundenen, die andere entweder mit dem Serum einer im Eruptionsstadium der Seuche befindlichen Kuh oder mit einem spezifischen, durch Immunisierung gegen das Virus erhaltenen Serum, welches letzteres von dem hiesigen Institute zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bezogen wurde. Diese Kontrollproben hatten den Zweck festzustellen, daß das zu der Versuchsreihe dienende und vorher ausgewertete Antigen seinen Titer beibehalten hatte, d. h. mit normalem Serum einen Ausschlag von bloß Bruchteilen eines Tropfens, hingegen mit spezifischem Serum eine Zunahme von mehr

als einem Tropfen aufwies. Die Wertbestimmung der einzelnen Antigene wurde in einem Vorversuche nach dem Schema von M. Ascoli und Izar in der Weise ausgeführt, daß verschiedene Verdünnungen des Antigens einerseits mit normalem, andererseits mit spezifischem Serum in den oben angegebenen Verhältnissen zusammengebracht wurden und nach entsprechendem Verweilen im Wasserbade und Erkalten die Zunahme der Tropfenzahl gegenüber dem bloß mit Kochsalzlösung versetzten Serum ermittelt wurde. Zu dem Hauptversuche wurde dann jene Konzentration des Antigens verwendet, welche mit normalem Serum eine Zunahme von höchstens einem halben Tropfen, mit spezifischem Serum von über anderthalb Tropfen gezeigt hatte. Wegen der leichten Zersetzlichkeit des Antigens unterließ ich jedoch bei dem Hauptversuche die erwähnten Kontrollproben niemals und verwertete die erzielten Resultate bloß dann, wenn jene den an sie gestellten obigen Forderungen entsprachen.

Es ist nämlich bei der Meiostragminreaktion der Maul- und Klauenseuche gerade das Antigen ein wegen seiner Zersetzlichkeit und seiner Schwankungen oft unberechenbarer Faktor, der einem die unangenehmsten Ueberraschungen bereitet; im Laufe meiner Untersuchungen ist es mir mehrmals passiert, daß vorzügliche Antigene, die ganz erhebliche Ausschläge mit spezifischem Serum lieferten, sich schnell abschwächten und in wenigen Tagen inaktiv wurden.

Als meiostragmin-positiv wurden jene Sera betrachtet, die mit der ausgewerteten Verdünnung des Antigens einen Mehrausschlag von mindestens einem Tropfen als bei bloßem Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung gaben.

Meiostragmin-positiv waren vor allem die mir zur Verfügung stehenden Immunsere gegen Maul- und Klauenseuche. Von 28 geprüften Sera, die von verseuchten Tieren herührten, welche im Eruptionsstadium der Maul- und Klauenseuche sich befanden, gaben 26 eine positive, 2 eine negative Reaktion. Von 36 Sera, welche nicht an Maul- und Klauenseuche leidenden Tieren entnommen waren, zeigten bloß zwei Ausschläge von mehr als einem Tropfen; von diesen beiden stammte eines aus einem Bestande, welcher uns als verseucht gemeldet worden war, während die Angabe vom Besitzer als unbegründet zurückgewiesen wurde; das andere stammte vom Schlachthause, wo es mit anderen dreizehn gesammelt worden war, die insgesamt Ausschläge von bloß Bruchteilen eines Tropfens lieferten. Hingegen war keines der von unseren zur Lymphgewinnung dienenden Tieren herrührenden Sera meiostragmin-positiv.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Meiostragminprobe nach Hebung der Sperre an denselben Tieren wiederholt, welche im akuten Stadium der Erkrankung positive Reaktionen geliefert hatten und auch an den Tieren versucht, die aus anderen Beständen stammten, wo im Laufe des Jahres die Seuche geherrscht hatte. Von 15 geprüften Sera lieferten vier Werte, die auf Grund der gezogenen Grenzen als meiostragmin-positiv gelten dürfen. Hervorzuheben wäre der positive Ausfall der Meiostragminreaktion bei einer Kuh, die vor ungefähr fünf Monaten an Maul- und Klauenseuche gelitten hatte und von dem Tierarzte für die Einschleppung der Seuche in einen vor ihrem Eintritte verschont gebliebenen Stall verantwortlich gemacht wurde.

Der positive Ausfall letzterer aus äußeren Gründen bisher allein stehenden Probe deutet darauf hin, daß die serodiagnostische Prüfung vielleicht zur Ermittlung jener Virus-träger dienen könnte, denen Loeffler eine so große Bedeutung bei der Verbreitung der Seuche beimißt.

Tatsächlich findet der positive Ausfall der Meiostragminreaktion bei genesenen Tieren ein Analogon in dem Verhalten des Serums bei anderen Krankheiten: es werden ja auch andere serodiagnostische Reaktionen, die Agglutination, die Bakteriolysse, die Bestimmung des opsonischen Index, die Komplementbindung, nach Ueberstehen von Typhus, Cholera, Dysenterie eine Zeitlang positiv gefunden und zur Erkennung von Bazillenträgern verwendet.

Die Reaktion könnte demnach bei der Bekämpfung der Maul- und Klauenseuche Anwendung finden, falls weitere Unter-

suchungen bestätigen sollten, daß sie bei Virusträgern regelmäßig oder häufig positiv ausfällt.

Aus diesem Grunde schien mir ein kurzer Bericht über meine Versuche auch an dieser Stelle statthaft, um die Interessenten auf die praktische Verwertbarkeit der Reaktion aufmerksam zu machen und zu einer Prüfung ihrer wirtschaftlichen Tragweite anzuregen.

Zusammenfassung. Das Blutserum der von Maul- und Klauenseuche befallenen Tiere zeigt bei Zusatz von Extrakten des Virus eine spezifische Verminderung der Oberflächenspannung resp. eine Zunahme der von demselben Volumen gelieferten Tropfenzahl; d. h. es reagiert meiotagmin-positiv. Die Meiotagminprobe kann auch nach dem Ueberstehen der Seuche eine Zeitlang positiv ausfallen und vielleicht zur Ermittlung von Virusträgern dienen.