Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Berlin.
(Stellv. Direktor: Prof. B. Heymann.)

Zur Frage der Virulenzsteigerung säurefester Saprophyten durch Tierpassagen¹⁾.

Von Prof. Bruno Heymann und Dr. Walter Strauß, Assistent am Institut

Vor etwa 1½ Jahren veröffentlichten Kolle, Schloßberger und Pfannenstiel, zuerst in dieser Wochenschrift (1920, Nr. 52), dann ausführlicher in den „Arbeiten aus dem Staatsinstitut für experimentelle Therapie und dem Georg Speyer-Hause zu Frankfurt a. M.“ (1921, H. 12) höchst bemerkenswerte Ergebnisse, zu denen sie bei Versuchen über Virulenzsteigerung säurefester Saprophyten gelangt waren. Während bisher andere Autoren in zahlreichen gleichgerichteten Versuchen einwandfreie, positive Resultate niemals erzielen konnten, war es den Frankfurter Forschern gelungen, die Pathogenität saprophytärer Butter- und Timothee-, Kaltblüter-, Vogel- und Säugetierbazillen durch Meerschweinchen- und Mäusepassagen derart zu steigern, daß „sich der Befund bei den meist spontan gestorbenen Tieren mit Zunahme der Passagen immer mehr dem Bilde näherte, wie es nach Einverleibung von echten Tuberkelbazillen zu beobachten ist“, bis schließlich „die pathologischen Veränderungen, die bei den mit Passagestämmen infizierten Tieren zu beobachten waren, durchaus das Bild einer echten disseminierten Tuberkulose mit Knötchenbildung und zentralen Verkäsungsherden zeigten“. Als äußeres Kennzeichen der Umwandlung traten auch Veränderungen im Wachstum der Reinkulturen auf: Während sich die Ausgangskulturen bei der optimalen Temperatur von 22–28° zu schnell aufgehenden, üppigen Rasen entwickelten, wuchsen die passierten Stämme weitaus am besten bei 37° (nie bei Zimmertemperatur), aber auch dann nur langsam und in trockenen, durchaus tuberkelbazillenartigen Kolonieförmigkeiten. Obwohl sich demnach diese „adaptiv veränderten“ Bakterien nicht von Tuberkelbazillen unterscheiden

ließen, obwohl ferner auch das weitere Studium der Passagestämmen und ihrer pathologisch-anatomischen Wirkungen durch Pfannenstiel, Jaffé und Igersheimer nicht die geringsten Unterscheidungsmerkmale zwischen den Passagekulturen und echten Tuberkelbazillen erbrachten, scheuten die Autoren dennoch die theoretischen und praktischen Folgerungen aus ihren Beobachtungen. „Es wäre verfehlt und verfrüht“, so schreiben sie, „aus den Veränderungen des Wachstums der Kulturen und der Virulenzsteigerung, die bei den aus Passagereihen erhaltenen Stämmen beobachtet wurden, vorläufig zu weitgehende Schlüsse für die Differenzierung der Gruppe der säurefesten Bakterien oder hinsichtlich der Pathogenese der Tuberkulose oder im Hinblick auf die praktische Verwertung der Ergebnisse für Immunisierungszwecke zu ziehen.“ Diese Zurückhaltung scheint uns allzu vorsichtig zu sein. Unseres Erachtens ist vielmehr aus all' diesen Beobachtungen der Schluß berechtigt, daß es Kolle und seinen Mitarbeitern in der Tat gelungen ist, saprophytische säurefeste Bakterien durch mehrere, oft sogar schon durch eine Tierpassage in echte Warmblütertuberkelbazillen umzuwandeln.

Diese grundlegend wichtige Feststellung von so maßgebender Seite hat bisher eine auffällig geringe Beachtung gefunden. Unseres Wissens hat nur B. Lange über Nachprüfungen berichtet, die er mit je 3 Kolleschen Ausgangs- und Passagestämmen angestellt hat. Er bestätigte die außerordentlich hohe Virulenz der Passagestämmen, hält sie aber nicht für Abkömmlinge der Ausgangskulturen, sondern für echte Tuberkelbazillen, die durch „eine komplizierende Infektion der Versuchstiere“, vielleicht auf dem Wege der spontanen Kontaktinfektion, hinzutreten seien.

Gleichzeitig mit Lange haben auch wir Versuche angestellt, über deren Verlauf hier kurz berichtet werden soll.

Es standen uns folgende, von Prof. Schloßberger freundlichst überlassene, 5 Ausgangs- und 10 Passagekulturen zur Verfügung:

1. Butterbazillus Rabinowitsch (S 1) mit dem Passagestamm aus der 3. (S 1a) und mit 2 Passagestämmen aus der 5. Passage (S 1d und S 1e).

2. Friedmanns Schildkrötentuberkelbazillus (Tb 10) mit den Passagestämmen aus der 2. (Tb 10c), der 5. (Tb 10h) Passage und der 2. Passage des Stammes Tb 10c (Tb 10c b).

3. Froschtuberkelbazillus, Stamm Küster (Tb 18) mit dem Passagestamm aus der 1. Passage (Tb 18a).

4. Homogener menschlicher Tuberkulosestamm Arloing (Tb 12) mit dem Passagestamm aus der 1. Passage (Tb 12a).

5. Hühnertuberkelbazillus (Tb 13) mit den Passagestämmen aus der 1. (Tb 13b) und aus der 3. Passage (Tb 13c).

Mit diesen Kulturen wurden folgende drei Hauptversuchsreihen ausgeführt:

1. Versuche zur Prüfung der Virulenz der Frankfurter Ausgangs- und Passagekulturen;

2. Passageversuche von Tier zu Tier mit den Frankfurter Ausgangskulturen;

3. Passageversuche mit selbstgewonnenen („Berliner“) Passagekulturen der Frankfurter Ausgangsstämme.

Sämtliche Tiere wurden vor dem Versuch mittels intrakutaner Tuberkulinreaktion auf Tuberkulosefreiheit geprüft. Die Impfung geschah fast durchweg intraperitoneal. Unsere Versuchsreihen blieben von Stallseuchen verschont; durch interkurrente Krankheiten hatten wir nur sehr wenige Verluste.

Ueber die Einzelheiten der Versuchsbedingungen und über die Resultate gibt nachstehende (auf Wunsch der Redaktion stark gekürzte) Tabelle Auskunft.

Tabelle 1.

	Zahl der Impftiere	Impfdosis in mg	Ergeb. d. 1. Impfung („1. Passage“ nach Kolle)	Welterimpfung („2. Passage“)
			Tub.-Reakt.	Sektionsbefund
Frankfurter Ausgangskulturen				
Butterb. Rab. S 1	10	60–100	—	3 Milzverwachungen, 2 auch Netz- u. Leberknötchen. Die and. o. B.
Schildkr. Frdm. Tb 10	10	100	—	5 Milzverwachungen, Netz- u. Leberknötchen. Die übrigen o. B.
Stamm Arloing Tb 12	4	55–60	—	alle Milzverwachungen, Netzknötchen, Milzschwellungen.
Hühnertub. Tb 13	4	50	—	alle starke Milzschwellungen.
Froschtuberk. Küster Tb 18	11	100	—	4 Br.-Dr., Milzverw., Leber- u. Netzknötchen
Frankfurter Passagekulturen				
S 1a, S 1d, S 1e	16	50–1/100 000	+++	Tuberkulose
Tb 10c, Tb 10h, Tb 10cb	15	50–1/100 000	+++	Tuberkulose
Tb 12a	3	1–1/100 000	+++	Tuberkulose
Tb 13b, Tb 13c	8	25–1/100 000	+ bis +++	Tuberkulose
Tb 18a	6	50–1/100 000	+++	Tuberkulose
Berliner Passagekulturen				
S 1p	2	60	—	noch lebend, gesund
Tb 12p	1	55	—	Netzknötchen, Milzschwellung
Tb 13p	2	10–20	—	noch lebend, gesund

¹⁾ Gekürzte Wiedergabe eines am 10. VII. 1922 in der Berliner Mikrobiologische Gesellschaft von B. Heymann gehaltenen Vortrages. Die ausführliche Arbeit von W. Strauß wird demnächst in der Zschr. f. Hyg. erscheinen. Die Versuche sind mit dankenswerter Unterstützung der Robert Koch-Stiftung zur Bekämpfung der Tuberkulose ausgeführt.

Hieraus lassen sich nachstehende Schlüsse ableiten:

1. Die Frankfurter Ausgangskulturen ergaben bei den meisten Versuchstieren keine oder ganz geringfügige, nur bei wenigen so ausgesprochene Veränderungen, daß eine Weiterimpfung von Organteilen aussichtsvoll erschien. Die Tiere wurden zum größten Teil nach 3 bis 6 Monaten getötet; spontan starben in größerer Zahl nur die (in übertrieben hohen Dosen) mit Tb 13 (Hühnertuberkulose) und Tb 12 (Stamm Arloing) geimpften Tiere. Die oft wiederholten Tuberkulinreaktionen verliefen stets negativ.

Die Frankfurter Passagekulturen erzeugten in Dosen bis zu $\frac{1}{100\,000}$ mg ausnahmslos, zum Teil hochgradige Tuberkulose. Die Tuberkulinreaktion war stets positiv.

2. Die Weiterübertragung krankhaft veränderter Organe von mit Frankfurter Ausgangskulturen geimpften Tieren führte nur bei dem Stamm Arloing zu nennenswerten — auch hier niemals stärkeren — Veränderungen. Alle anderen Tiere blieben gesund. Die Tuberkulinreaktion war stets negativ.

3. Selbst gezüchtete (Berliner) Passagekulturen aus Tieren, die mit 3 verschiedenen Frankfurter Ausgangskulturen geimpft und nach 4—12 Wochen getötet wurden, verursachten trotz gleich hoher Dosierung¹⁾ niemals stärkere pathologische Veränderungen als die Ausgangskulturen. Auch hier war die Tuberkulinprobe stets negativ. —

Die von Kolle und seinen Mitarbeitern beobachtete Virulenzsteigerung ist uns also in keinem einzigen Falle, weder bei unmittelbaren Tierpassagen, noch bei Übertragung von Passagereinkulturen gelungen. Mehr Passagereinkulturen konnten zu diesen Versuchen nicht herangezogen werden, da die Herauszüchtung bei anderen Stämmen nach längerem Verweilen im Tierkörper nicht mehr gelang und die Versuche aus Rücksicht auf die hohen Kosten nicht noch weiter ausgedehnt werden konnten.

Es sei noch besonders bemerkt, daß sich die Berliner Passagekulturen auch bezüglich des Wachstums und des Temperaturoptimums in keiner Weise von ihren Frankfurter Ausgangskulturen unterschieden.

Worauf diese unüberbrückbare Kluft zwischen Kolles und unseren Ergebnissen beruht, ist schwer zu sagen. Für die Auffassung, daß es sich bei den Frankfurter Passagekulturen um echte Tuberkelbazillen handelt, spricht

1. die starke Virulenz noch in sehr hohen Verdünnungen;
2. die ausnahmslos positive Tuberkulinreaktion.

Besonders interessant in letzterer Richtung waren Versuche, die mit dem Hühnertuberkelbazillusstamm Tb 13, mit seinen Passagestämmen Tb 13b und Tb 13c und mit dem selbstgewonnenen Passagestamm Tb 13p angestellt wurden.

Tabelle 2.

Lfd. Nr.	Die Tiere waren vorbehandelt mit:	Intrakut. Prüfung mit $\frac{1}{100}$ Oese Typ. gallinac.	Prüfung mit Kochschem Tuberkulin
1.	Frankfurter Ausgangskultur Tb 13 . .	++	—
2.	Frankfurter 1. Passagekultur Tb 13b .	—	+++
3.	Frankfurter 3. Passagekultur Tb 13c .	—	+++
4.	Berliner 1. Organpassage	++	—
5.	Berliner 1. Passagekultur Tb 13p . .	+++	—
6.	Typ. humanus-Reinkultur	—	+++
7.	Gesundes Kontrolltier	—	—

Wie die Tabelle zeigt, gab nur der Frankfurter Ausgangsstamm und seine Berliner Passagekulturen eine Reaktion mit Hühnertuberkelbazillen, während umgekehrt auf Kochsches Tuberkulin nur die Frankfurter Passagestämme reagierten.

Auf Grund dieser, wie auch anderer Untersuchungen haben wir begründeten Anlaß zu der Ansicht, daß die Frankfurter Passagestämme keine Mischkulturen, sondern Reinkulturen von echten Tuberkelbazillen sind; doch würde die Schilderung dieser weiteren Prüfungen hier zu weit führen. Wir möchten nur anfügen, daß sich der auch im Kaninchenversuch geprüfte Stamm 18a als ein echter humaner Tuberkelbazillus erwiesen hat.

Betont sei schließlich noch, daß sich die aus der gleichen Ausgangskultur gewonnenen Frankfurter Passagestämme verschieden hoher Passagezahl durchaus gleich virulent zeigten, daß also von einer stufenweisen Zunahme der Virulenz „mit Zunahme der Passagen“ nicht gesprochen werden kann.

Die Ursachen für das Auftreten echter Tuberkelbazillen, zum Teil bereits in den ersten Impftieren, sind nicht ohne weiteres zu durchschauen. Für recht unwahrscheinlich halten wir es, daß die bei 8 verschiedenen Stämmen verblüffend gleichmäßigen Ergebnisse Kolles und seiner Mitarbeiter — die Autoren sprechen geradezu von „biologischer Gesetzmäßigkeit“ — durch eine Spontaninfektion auf dem Kontaktwege, wie Lange will, zu erklären sind. Von 23 Kontrolltieren, die wir zu 25, zum Teil monatelang, Tuberkel-

bazillen aus offenen Geschwüren abscheidenden Meerschweinchen gesetzt haben, ist nur ein einziges tuberkulös erkrankt.

Eher wäre an Ansteckung durch einen tuberkelbazillenverstreuten Phthisiker zu denken. Doch müssen wir die Aufklärung dieser wohl als Hausinfektion zu deutenden Ergebnisse den Frankfurter Forschern überlassen.

¹⁾ Nur der Stamm Tb 13p mußte auf Grund der Erfahrungen mit der Ausgangskultur in kleineren Dosen verimpft werden.