Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Marburg und dem Hygienischen Institut in Posen.

Beitrag zur Kenntnis der Milzbrand-Immunität.

Von Prof. Erich Wernicke.

In den Jahren 1897 bis 1899¹⁾ hatte ich Gelegenheit, auf Anregung von v. Behring Immunisierungsversuche bei Milzbrand an großen Tieren, Ziegen, Schafen, Rindern und Pferden, sowie an kleinen Laboratoriumstieren anzustellen. Aus äußeren Gründen ist damals eine zusammenhängende Publikation dieser Versuche, die im März 1899 abgeschlossen waren, unterblieben. Da aber einige der damals erreichten Ergebnisse bei der Immunisierung von Meerschweinchen gegen Milzbrand auch durch die bisherige Forschung noch nicht erreicht bzw. noch nicht überholt sind, so ist eine kurze Darlegung dieser experimentellen Arbeiten auch heute noch am Platze, um so mehr zum 60. Geburtstage v. Behrings. Hat v. Behring doch damals diese Untersuchungen mit besonderem Interesse verfolgt und mich mit Rat und Tat bei diesen Arbeiten unterstützt, namentlich aber auch das große Tiermaterial, das diese Versuche erforderten, bereitwilligst zur Verfügung gestellt. Das wichtigste Ergebnis dieser Versuche, die gelungene und bis dahin nicht für möglich gehaltene aktive Immunisierung von Meerschweinchen gegen vollvirulenten Milzbrand ist seinerzeit von v. Behring Herrn Metschnikoff mitgeteilt. Dieser Forscher hat unter Wahrung der Priorität der Versuche des Marburger Institutes in seinem vortrefflichen Werke Immunität bei Infektionskrankheiten (Jena 1902, S. 222) darüber berichtet und die Nachprüfung unserer Versuche von seinem Schüler de Nittis vornehmen lassen. Dieser hat in einer schönen experimentellen Arbeit in den Annales de l'Institut Pasteur (15 S. 769 „Sur l'immunité des pigeons et des cobayes“) das Resultat unserer Versuche voll bestätigt.

Die grundlegenden Arbeiten von Selavo, Marchoux und

Sobernheim aus den Jahren 1895 und 1897 hatten die Möglichkeit einer Serumtherapie bei Milzbrand erwiesen. Unsere Arbeiten wurden nach gleicher Richtung hin unternommen. Als Ziel wurde gesteckt, durch die Immunisierung großer Tiere ein solches Serum zu erhalten, das auch eventuell bei Meerschweinchen und Mäusen, den für Milzbrandinfektion bekanntlich empfänglichsten Tieren, immunisierende und heilende Eigenschaften entfalten möchte. Dieses Ziel ist von uns nicht erreicht, ebensowenig wie es bis heute auch anderen Forschern gelungen ist, ein so wirksames Serum darzustellen, das eine passive Immunität bei Meerschweinchen und Mäusen erzeugte.

Der Gang, den unsere Marburger Versuche nahmen, war nun, in aller Kürze dargelegt, folgender.

Für die beabsichtigten Immunisierungsarbeiten bei Milzbrand an großen Tieren sollte zunächst der Versuch gemacht werden, aus den Kulturen ein Milzbrandgift zu gewinnen. Auf die allermannigfachste Weise angestellte Experimente haben aber es auch uns wie anderen Forschern nicht gelingen lassen, ein wirkliches Milzbrandtoxin aufzufinden und darzustellen. Ausgiebige Versuche mit abgetöteten Milzbrandkulturen und Kulturfiltraten, im Experiment zunächst bei Meerschweinchen geprüft, haben keinerlei Substanzen ergeben, die eine spezifische Giftigkeit bzw. Immunität bei Meerschweinchen in die Erscheinung treten ließen.

Vorausgegangen waren diesen Experimenten Passagenimpfungen bei Meerschweinchen, welche die Virulenz bzw. Giftigkeit der Kulturen höchstgradig steigern sollten. Der im Institut vorhandene virulenteste Milzbrandstamm, der in der Verdünnung von $1/1000000$ Kultur Meerschweine in 24–60 Stunden an der Infektion zugrunde gehen ließ, wurde durch 31 Meerschweinchenpassagen geschickt.

Da für Experimente an großen Tieren Milzbrandgifte nicht erhalten werden konnten, so wurde ihre Immunisierung zunächst mit Vakzins nach Pasteurs grundlegender Methode vorgenommen. Und zwar wurden aus einer sehr virulenten Kultur Vakzins in der Art dargestellt, daß diese Kultur bei Temperaturen zwischen 42–43° im Brutschrank behufs ihrer Abschwächung gezüchtet wurde.

Milzbrand I bedeutet eine Kultur, die sieben Tage bei obiger Temperatur gewachsen war, sie tötete Mäuse in Menge von $1/100$ Agarkultur schnell und sicher.

Milzbrand II war eine Kultur, die vier Tage im Brutschrank bei über 42° in Bouillon gewachsen war, sie tötete Mäuse und Meerschweine sicher.

Milzbrand III ist ein anderer Stamm als Milzbrand II, auch dieser war vier Tage bei über 42° im Brutschrank gezüchtet.

Milzbrand IV, der gleiche Stamm wie Milzbrand III, war nur zwei Tage bei 42° gewachsen. Zu bemerken ist, daß bei diesen Züchtungen der Brutschrank gelegentlich auch auf über 43° heraufgegangen war. Außer diesen Kulturen stand hochgradig virulenter unabgeschwächter Milzbrand zur Verfügung und außerdem eine Milzbrandkultur „Rattenmilzbrand“. Diese Kultur tötete weiße Ratten prompt und sicher in starker Verdünnung in Bouillon. Ich verdanke sie v. Esmarch (Göttingen).

Die Immunisierungsversuche begannen zunächst an Ziegen mit Milzbrand I.

Eine Ziege, Nr. 11, erhielt am 12. Oktober 1897 $1/10$ Agarkultur Milzbrand I, sie erkrankte nach sechs Tagen an hohem Fieber, bis 40,8°, blieb dann dauernd schwer krank; die Temperatur erreichte am 29. Oktober 41,1°; das Tier wurde getötet. Die Milz war sehr groß, enthielt aber nur wenig Bazillen.

Eine andere Ziege, Nr. 3, erhielt am 20. Oktober 1897 $1/5$ Agarkultur Milzbrand I, sie erkrankte am 25. Oktober mit hohem Fieber, das andauernd über 40° blieb und am 28. Oktober bis 41,9° stieg. Am 29. Oktober wurde das Tier tot im Stall gefunden. Die Sektion ergab eine kleine Milz; lange Milzbrandfäden in allen Organen.

Milzbrand I war also für Ziegen von einer erheblichen Virulenz.

Eine dritte Ziege reagierte aber auf eine subkutane Injektion von $1/10$ Agarkultur Milzbrand I nach einigen Tagen nur mit einer geringen lokalen Anschwellung an der Injektionsstelle und mehrtägigem Fieber. Am 20. Oktober erhielt sie $1/5$ Agarkultur, die nur ein vorübergehendes Kranksein erzeugte. Am 26. Oktober erfolgte die weitere Immunisierung mit 3 Agarkulturen Milzbrand I. Das darauffolgende Fieber war nur von kurzer Dauer, sodaß am 3. November eine Injektion einer Agarkultur Milzbrand II folgte; darauf wurden am 11. November 4 Agarkulturen Milzbrand II injiziert. Das Tier reagierte mit etwas Fieber

¹⁾ Ich war damals stellvertretender Direktor des Hygienischen Instituts in Marburg.

und lokalen Anschwellungen an den Injektionsstellen, an denen aber Milzbrandbazillen nicht nachweisbar waren; sie waren also im Körper der Ziege zu Grunde gegangen. Am 24. November, 29. November und 6. Dezember folgten Injektionen von $\frac{1}{10}$; $\frac{1}{1}$ bzw. 6 ganzen Agarkulturen Milzbrand III subkutan ohne wesentliche Reaktionen, und am 15. Dezember 2 ganze Agarkulturen Milzbrand IV. Jetzt wurde zu voll virulentem Milzbrand übergegangen. Am 29. Dezember wurde zunächst $\frac{1}{100}$ Agarkultur, am 17. Januar 1898 $\frac{1}{100}$ und am 8. Februar 1898 $\frac{1}{2}$ Agarkultur, am 5. März 5 Agarkulturen und am 13. April 50 ganze Agarkulturen des virulentesten Milzbrandes injiziert und ohne besondere Reaktion glatt vertragen.

Das Blutserum dieser höchstgradig immunisierten Ziege zeigte, Meerschweinchen in Mengen von 15 ccm injiziert, keinerlei immunisierende Wirkungen gegen Milzbrand; auch im Urin waren keinerlei Antikörper nachweisbar. Das Serum erzeugte vielmehr bei Meerschweinchen erhebliche Anschwellungen, und nach mehrfach wiederholten Injektionen gingen einige Meerschweinchen zu Grunde.

Die Immunisierung von zwei Ochsen erfolgte in ganz ähnlicher Weise. Beide, zwei einjährige, gesunde Tiere, vertrugen am Schlusse ihrer Immunisierung 50 bzw. 75 ganze Agarkulturen des virulentesten Milzbrandes. Ihr Blutserum hatte aber keinerlei immunisierende Eigenschaften bei Meerschweinchen gegen virulente Milzbrandinfektion.

Gedenken will ich noch einer Milzbrandimmunisierung bei einem Pferde (Rappe Nr. 64), der von vornherein mit virulentem Milzbrand in allmählich steigenden Dosen von $\frac{1}{2000}$ Agarkultur bis $\frac{1}{10}$ Agarkultur behandelt wurde und dauernd gesund blieb. Es gelang also hier eine Immunisierung, die von vornherein mit vollvirulentem Milzbrande unternommen wurde.

Bei den Immunisierungsversuchen bei großen Tieren erhielt man bei der fast täglichen Prüfung der Virulenz der Kulturen an Meerschweinchen ein großes Material von toten Tieren.

Um diese für die Immunisierungsversuche auszunutzen, wurden die Organe dieser Tiere, wie Milzen, Lebern, Gehirne, Lungen und Herzen, in der Art und Weise verarbeitet, daß diese Teile zu einem möglichst feinen Organbrei verarbeitet wurden, der massenhaft Milzbrandbazillen enthielt. Dieser Brei wurde dann mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt, und schließlich wurde soviel Formalin hinzugefügt, daß die ganze Mischung eine $\frac{1}{2}$ % ige Formalinlösung darstellte. Einige Stunden nach dem Formalinzusatz war der Organbrei steril. Mit dem Preßsaft, der reichlich Milzbrandbazillen enthielt, wurden nun in steigenden Dosen zahlreiche Meerschweinchen und Mäuse injiziert. In gleicher Weise wurden die Organe ganz gesunder Meerschweinchen behandelt und mit solchen Säften gleichfalls Meerschweinchen injiziert. Solche Preßsäfte wurden bei subkutaner Injektion nach einiger Zeit glatt resorbiert.

Bei der Prüfung dieser Tiere auf eine eventuell zustande gekommene Immunität zeigte es sich, daß die mit Extrakten aus Organen gesunder Laboratoriumstiere injizierten Meerschweinchen durch die Injektion keinerlei Immunität oder Resistenz gegenüber virulentem Milzbrand erlangt hatten; eine Reihe von Meerschweinchen aber, die mit dem sehr reichlich Bazillen enthaltenden Extrakt aus Organen von an Milzbrand frisch verendeten oder sub finem vitae getöteten Tieren wiederholt injiziert worden waren, gingen nach Injektionen kleinerer Dosen virulenten Milzbrandes nicht zu Grunde, sondern blieben dauernd am Leben; ja einige vertrugen wiederholte, selbst größerer Mengen vollvirulenten Milzbrandes schließlich ohne jede Reaktion. Diese Versuche knüpften gewissermaßen an die bekannten allerersten Immunisierungsversuche bei Milzbrand von Toussaint aus dem Jahre 1880 an, die mit auf 55° erhitztem Blut an milzbrandigen Tieren vorgenommen wurden.

Die Bazillen waren im Blute bei Toussaints Versuchen aber nicht abgetötet, sondern in ihrer pathogenen Wirksamkeit nur abgeschwächt. Toussaint hatte seine Versuche an Schafen angestellt, die im Gegensatz zu Meerschweinchen, wie alle nachmaligen Versuche gezeigt haben, sehr leicht gegen Milzbrand zu immunisieren sind.

de Christmas hatte 1891 Kaninchen mit Blut und Organen von Milzbrandtieren gegen Milzbrand immunisiert, nachdem er die darin enthaltenen Keime durch Eucalyptusöl abgetötet hatte.

Nach meinen Erfahrungen sind Kaninchen bei Milzbrandversuchen nicht immer zuverlässige Versuchstiere, da man je nach Alter, Geschlecht und Rasse nach Impfung auch mit anscheinend vollvirulentem Milzbrand bei kleinen Dosen Tiere überleben sieht. Meerschweinchen dagegen reagieren auf Milzbrand-

infektionen stets prompt und sicher. Da es mit den verschiedensten Organextrakten milzbrandiger Tiere gelungen war, einige Meerschweinchen zu immunisieren, wenn diese Extrakte nur reichlich Bazillen enthielten, so kam ich zu der Ansicht, daß nicht die injizierten Zell- und Organsäfte der Tiere, sondern die darin enthaltenen und durch Formalin abgetöteten Bazillenleiber die Immunität bei den Injektionen erzeugten, daß also die Möglichkeit nachgewiesen war, auch Meerschweinchen mit Milzbrandbakterien zu immunisieren. Blut und Organextrakte auf diese Art immunisierter Meerschweinchen, in deren Körpern die Bazillen zu Grunde gingen, übertrugen übrigens nicht die Immunität auf gesunde Meerschweinchen.

Jeder, der längere Zeit mit Milzbrandbazillen arbeitet, macht die Erfahrung, daß Milzbrandkulturen bei Weiterzüchtungen auch in der gewöhnlichen Art, nicht bei höherer Temperatur, an ihrer Virulenz Einbuße erleiden. So beobachtete ich bei einem Milzbrandstamm, der sehr häufig oft viele Tage hintereinander von Kultur zu Kultur auf Agar übertragen war, daß dieser früher für Meerschweinchen sehr virulente Stamm, in Dosen von $\frac{1}{100}$ — $\frac{1}{20}$ Agarkultur, seine Virulenz für Meerschweinchen verloren hatte. Bei näherer Prüfung dieser Kultur zeigte es sich, daß erst Dosen dieser Kultur von einer halben bis einer ganzen Agarkultur Meerschweinchen töteten. Die Tiere gingen erst nach Verlauf mehrerer Tage zu Grunde, und zwar entstand nach der subkutanen Injektion ein geradezu ungeheures Oedem an Bauch, Brust und Hals, das namentlich die ganzen Halsorgane durchtränkte, sodaß die Tiere anscheinend auch an Glottisödem starben. Die in dem Oedem enthaltenen Bazillen zeigten Bildung längerer Fäden und allerhand Involutionsformen. Bei den weiteren Experimenten mit dieser im übrigen durchaus virulentem Milzbrand ähnlichen Kultur zeigte es sich, daß man mit ihrer Hilfe Meerschweinchen auch gegen den allervirulentesten Milzbrand immunisieren konnte.

Die Methode bestand darin, daß den Tieren von $\frac{1}{1000}$ dieser Kultur anfangend, in 8—10 tägigen Zwischenräumen ganz allmählich immer größere Dosen bis zu einer ganzen Agarkultur steigend beigebracht werden konnten. Waren die Tiere so gegen diesen ganz schwachen Stamm immunisiert, so vertrugen sie Injektionen mit vollvirulentem Milzbrand. Wenn man vorsichtig die Injektionen virulenten Milzbrandes, mit sehr kleinen Dosen beginnend, ganz allmählich steigerte, so gelang es, Meerschweinchen sogar gegen eine ganze Agarkultur „Rattenmilzbrand“ zu immunisieren. — Blutserum oder Organsaft dieser hochgradig immunisierten Tiere übertrugen auffallenderweise die Immunität aber nicht auf andere Meerschweinchen.

Als ich v. Behring von der gelungenen Immunisierung von Meerschweinchen gegen virulenten Milzbrand, was bis dahin nicht für möglich gehalten wurde, Kenntnis gab, interessierte ihn diese Mitteilung so, daß er selbst die Immunität dieser von mir immunisierten Tiere mit besonderen virulenten Kulturen prüfte und meine Ergebnisse bestätigen konnte. v. Behring hat darüber in seinen Beiträgen zur experimentellen Therapie, H. 5 „Tuberkulose“ (Marburg 1902 S. 17) berichtet.

Nachdem v. Behring darauf hingewiesen hatte, daß tuberkulosetherapeutische Versuche von ihm an Rindern und nicht an kleinen Laboratoriumstieren vorgenommen werden müßten, fährt er fort: „Nie wäre Pasteur dazu gelangt, die Möglichkeit einer Milzbrandimmunisierung beweiskräftig zu demonstrieren, wenn er nicht an Stelle der kleinen Laboratoriumstiere große Tiere zum Versuch herangezogen hätte. Noch heute gelingt es nicht, Meerschweinchen nach der Pasteurschen Methode gegen Milzbrand zu immunisieren, während die Versuche an Schafen schnell und sicher den Beweis liefern für die Leistungsfähigkeit der Pasteurschen Schutzimpfungen.“

Aehnlich steht nach meinen Untersuchungen auch die wissenschaftliche Beweisführung für diese Tuberkulose-Heilbarkeit. Sie gelingt leichter an Rindern als an Meerschweinchen.

„Seitdem ich dies (April 1898) schrieb, ist im Marburger Hygienischen Institute von Prof. Wernicke (1898/99) der unanfechtbare Beweis geliefert worden, daß auch Meerschweinchen milzbrandimmun gemacht werden können, und zwar in so hohem Grade, daß sie eine ganz vollvirulente Milzbrand-Agarkultur subkutan injiziert bekommen können, ohne Schaden zu nehmen. In tödlichen Minimaldosen läßt sich ein solcher Immunitätsgrad gar nicht ausdrücken; denn von den in einer Agarkultur vorhandenen Milliarden von Milzbrandbazillen genügt jede einzelne, um jedes nicht vorbehandelte Meerschweinchen zu töten.“

Das Zustandekommen der Milzbrand-Immunität ist auch heute noch nicht vollkommen erklärt. Vielleicht wird man durch weitere Studien über die Milzbrand-Immunität bei den hoch empfänglichen Meerschweinchen, die mir eine Zellimmunität zu sein scheint, weitere Aufschlüsse gewinnen.