

Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ (Direktor: Geheimrat Gaffky) und dem Hygienischen Institut der Tierärztlichen Hochschule (Direktor: Geheimrat Frosch) in Berlin.

### **Ueber die experimentelle Erzeugung von Tuberkulose-Antikörpern beim Rind; zugleich ein Beitrag zur Tuberkulose-Immunsierung.<sup>1)</sup>**

Von Stabsarzt Dr. E. Rothe, früher kommandiert zum Institut „Robert Koch“, und Dr. K. Bierbaum, früherem wissenschaftlichen Hilfsarbeiter am Hygienischen Institut.

Die Untersuchungen, über deren Ergebnisse hier kurz berichtet werden soll, wurden im Mai 1909 begonnen und im Juni 1911 zum Abschluß gebracht. Sie hatten das Ziel, eine praktisch-einfache Methode zu finden, die es ermöglicht, sicher, schnell und in großer Menge bei Rindern spezifische Tuberkulose-Antikörper zu erzeugen. Nachdem dies gelungen war, lag es nahe, durch weitere Versuche die Beantwortung der Frage nach der Bedeutung dieser Antikörper für den vorbehandelten Organismus im Hinblick auf Diagnose und Therapie der Tuberkulose zu versuchen und ferner festzustellen, ob dem gewonnenen antikörperhaltigen Serum eine Schutz- und Heilkraft im fremden Organismus zukommt. Außerdem wurde das spezifische Tuberkulose-Serum zur Auswertung der verschiedenen Tuberkuline im Reagenzglas benutzt.

Da somit unsere Versuche zur Gewinnung eines Tuberkulose-Serums mit einem hohen Gehalt an spezifischen Reaktionsstoffen rein praktische Ziele verfolgten, so wurden die Sera nur auf solche Reaktionsstoffe untersucht, deren Nachweis ohne große Schwierigkeit und mit genügender Exaktheit möglich ist. Diese Voraussetzung trifft nach unseren Erfahrungen nur zu für die im Komplementbindungsversuch nachweisbaren spezifischen Ambozeptoren, denen noch immer in der Literatur die nicht sehr glücklich gewählte Bezeichnung „Antituberkulin“ beigelegt wird, und für die Präzipitine.

Die Bestimmung beider Antikörperarten geschah in üblicher Weise im Reagenzglas. Als Antigen diente sowohl bei den Präzipitations- als auch bei den Komplementbindungsversuchen eine Testflüssigkeit, die folgendermaßen bereitet wurde:

Gut gewachsene Bouillonoberflächenkulturen von humanen Tuberkelbazillen werden auf einem Faltenfilter von der Kulturflüssigkeit abfiltriert und durch wiederholtes Uebergießen mit absolutem Alkohol gewaschen. Danach werden die Tuberkelbazillenmassen in eine Schale geschüttet und darin unter häufigem Umrühren mit 80–90% igem Alkohol eine Stunde lang belassen. Unter der Einwirkung des etwas wasserhaltigen Alkohols gelingt sicher die Abtötung der Tuberkelbazillen, wie durch häufige Meerschweinchenversuche festgestellt werden konnte. Solche durch Alkohol abgetöteten Tuberkelbazillen werden 8 Tage lang in der Kugelmühle zermahlen, aus der die aufs feinste zerriebene Masse, die keine färberisch nachweisbaren Bazillenleiber mehr enthält, mit destilliertem Wasser herausgespült wird. Durch scharfes Zentrifugieren dieser Spülflüssigkeit werden die wasserlöslichen Substanzen von den ungelöst gebliebenen getrennt. Aus ersteren wird unter genauester gewichtsanalytischer Kontrolle eine Verdünnung hergestellt, die in 1 ccm 10 mg Trockensubstanz und außerdem 20% Glycerin und 0,5% Phenol enthält. Diese milchig aussehende Stammlösung mit der Bezeichnung „T. O. I. 1 : 100“ erwies sich bei Aufbewahrung im Eisschrank als monatelang haltbar. Sie blieb von nachträglichen Ausfällungen frei und bewahrte ihren ursprünglichen Gehalt an gelöster

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen wurden ausgeführt mit Mitteln der Robert Koch-Stiftung und des Königl. Preußischen Ministeriums für Landwirtschaft, Domänen und Forsten. — Eine ausführliche Veröffentlichung erscheint demnächst in den „Veröffentlichungen der Robert Koch-Stiftung“.

Tuberkelbazillentreckensubstanz. Aus dieser Stammlösung wird die gebrauchsfertige Testflüssigkeit durch 25fache Verdünnung mit einer durch mehrfaches Filtrieren von allen Trübungen befreiten Phenol-Kochsalzlösung (0,5 bzw. 0,85 %) hergestellt. Sie enthält in 1 ccm 0,4 mg spezifische Trockensubstanz (T. O. I. 1 : 2500).

Die Vorbehandlung unserer Versuchsrinder zur Erzeugung antikörperhaltiger Sera geschah durch intravenöse Einspritzung verschiedener spezifischer Substanzen. Wir benutzten als solche: 1. Kochsches Alttuberkulin, 2. das vorstehend nach seiner Herstellung beschriebene T. O. I., also die wasserlöslichen Stoffe aus zerriebenen Tuberkelbazillen, 3. in ihrer Form erhaltene Tuberkelbazillen (sogenannte Vollbakterien), die zuvor in verschiedener Weise abgetötet waren. Bezüglich der letzteren war von vornherein anzunehmen, daß die biologischen Eigenschaften und die antigenen Substanzen der Tuberkelbazillen um so weniger Einbuße erfahren würden, je schonender ihre Abtötung erfolgte. In dieser Erwägung verwandten wir auf Veranlassung Robert Kochs Perlsuchtbazillen, die in seinem Laboratorium seit den Jahren 1901 und 1902 im Exsikkator über Schwefelsäure vor Licht geschützt aufbewahrt waren. Diese Tuberkelbazillen, auf die weder Chemikalien noch Hitze, sondern nur eine jahrelange Austrocknung eingewirkt hatte, erwiesen sich bei wiederholten Impfversuchen tatsächlich als abgestorben. Außer diesem Präparat wurden Tuberkelbazillen vom Typus humanus sowohl wie vom Typus bovinus verwandt, die nach dem oben beschriebenen Verfahren durch Alkohol abgetötet waren. Als drittes Vollbakterienpräparat benutzten wir schließlich frisch im Dampftopf durch einstündiges Erhitzen abgetötete Perlsuchtbazillen. Die Aufschwemmung der letzteren in Karbol-Kochsalzlösung war infolge starker Neigung der Bakterien zum Zusammenballen weniger gleichmäßig als die Aufschwemmungen der beiden erstgenannten Vollbakterienpräparate.

Von allen diesen Präparaten erwies sich das Alttuberkulin bezüglich seiner antikörperbildenden Kraft im Rinderserum als am wenigsten wirksam. Durch intravenöse Injektionen selbst großer Mengen (bis zu 20 ccm) kam eine nennenswerte Bildung spezifischer Antikörper nicht zustande. Mit den wasserlöslichen Substanzen aus zertrümmerten Tuberkelbazillen (T. O. I.) gelingt die Antikörpererzeugung, sie bleibt aber zurück hinter der durch sogenannte Vollbakterien erzielten. Mit diesen ist es möglich, Rindern, — und zwar, was im Gegensatz zu anderen Autoren (Ruppel und Rickmann) ausdrücklich betont werden muß, sowohl tuberkulösen wie tuberkulosefreien, tuberkulinempfindlichen wie unempfindlichen — einen hohen Gehalt an spezifischen Präzipitinen und komplementbindenden Ambozeptoren zu verleihen. Dabei macht es keinen Unterschied, ob die Tuberkelbazillen durch langjährige Austrocknung abgestorben oder durch Behandlung mit Alkohol abgetötet sind, ob bovine oder humane Bazillen verwandt werden. Es genügt eine einmalige intravenöse Einspritzung von 30 bis 50 mg Vollbakterien. Bei geringeren Impfdosen (5—10 mg) ist die Antikörperbildung unsicherer und weniger ergiebig. Durch die Erhitzung der Tuberkelbazillen im Dampftopf scheint die Fähigkeit, Antikörperbildung auszulösen, beeinträchtigt zu werden.

Die Antikörperbildung hat ihren Höhepunkt gewöhnlich am siebenten Tage erreicht. Der Gehalt an Antikörpern vermindert sich im ersten Monat nach der Einspritzung garnicht oder nur unbedeutend, erfährt aber im zweiten Monat eine sehr wesentliche Abnahme bis zum völligen Verschwinden. Nach dem Verschwinden kann später jederzeit durch Wiederholung der Einspritzung eine erneute Antikörperbildung veranlaßt werden. Zwischen komplementbindenden Ambozeptoren und Präzipitinen besteht in allen Punkten ein gewisser Parallelismus, aber durchaus keine absolute Uebereinstimmung.

Was nun die Bedeutung der im Rind nach unserem Verfahren durch intravenöse Einspritzungen toter Vollbakterien erzeugten spezifischen Tuberkulose-Antikörpern in bezug auf die Diagnose der Rindertuberkulose betrifft, so genügt ein nochmaliger Hinweis auf die Tatsache, daß die Antikörper sowohl im tuberkulösen wie im nichttuberkulösen Organismus in gleicher Weise experimentell erzeugt werden können. Da wir das Serum eines jeden unserer Versuchsrinder im Interesse

einer wirklich einwandfreien objektiven Bewertung des Einflusses unserer Behandlung auf die Antikörperbildung vor Beginn der Behandlung auf das Vorhandensein spontaner Tuberkulose-Antikörper untersucht haben, so sei hier auch über die Bedeutung der letzteren für die Diagnose ein Wort gesagt. Wir hatten schon bei Versuchen an 16 wahllos untersuchten Rindern, von denen mindestens 75 % tuberkulös waren, festgestellt, daß in keinem einzigen Falle ein höherer Gehalt an spezifischen Tuberkulose-Antikörpern durch unsere Untersuchungsverfahren nachgewiesen werden konnte. Ganz geringe Mengen fanden sich auch im Serum von Rindern, die bei der Schlachtung makroskopisch erkennbare tuberkulöse Veränderungen nicht aufwiesen. Unter unseren eigenen Versuchstieren (25) fand sich dreimal ein höherer Gehalt an spontanen komplementbindenden Ambozeptoren, darunter nur eins, das gleichzeitig über sehr reichliche Präzipitine verfügte. Alle drei Rinder waren tuberkulös, zwei hochgradig. Die Sera einiger anderer, ebenfalls tuberkulöser Rinder zeigten spontane Präzipitine, präzipitierten aber nur in höheren Konzentrationen (1 : 20, 1 : 10), ohne komplementbindende Ambozeptoren zu besitzen. Bei vier klinisch gesunden und anatomisch tuberkulosefreien Rindern hatte sich keine Spur von spontanen Antikörpern nachweisen lassen. Hiernach kommt auch den spontanen Antikörpern nur dann eine diagnostische Bedeutung zu, wenn sie in höherem Grade vorhanden sind, was aber nach unseren Erfahrungen nur selten vorzukommen scheint; ihr Fehlen spricht nicht für Freisein von Tuberkulose.

Ebensowenig wie das Auftreten spezifischer Antikörper bei Vorbehandlung mit Vollbakterien ist die dabei jedesmal eintretende hohe Fieberreaktion diagnostisch zu verwerten, da wir sie auch bei klinisch und anatomisch gesunden Rindern erhielten. Es scheint sich dabei vielmehr um nicht spezifische Reaktionen des Organismus auf die Einspritzung von Bakterien-eiweiß zu handeln. Die Fieberreaktionen würden also denen an die Seite zu stellen sein, die man z. B. bei intravenösen Impfungen von gesunden Pferden mit Typhus- und Cholera-bakterien erhält, wie sie zur Gewinnung von Immunsera vorgenommen werden. Mit diesem Vergleich würde auch die Entstehung spezifischer Antikörper im Blute tuberkulosefreier Rinder durch Einspritzung von Tuberkelbazillen in Einklang zu bringen sein, sowie die von uns festgestellte Tatsache, daß auch gesunde Pferde bei Einspritzung von Tuberkelbazillen (Vollbakterien) mit Fieber und Antikörperbildung reagieren. Entgegen der bekannten Tatsache, daß wiederholte Tuberkulineinspritzungen schließlich zur Tuberkulinunempfindlichkeit (Ausbleiben der Fieberreaktion) führen, blieb bei unseren Rindern, soweit wir an ihnen mehrfache Injektionen von Vollbakterien vorgenommen haben, die Fähigkeit, auf diese Einspritzungen mit hohem Fieber zu reagieren, erhalten.

Anders war das Verhalten unserer mehrfach mit Vollbakterien injizierten Rinder gegenüber der probatorischen Tuberkulineinspritzung. Diese eigentliche Tuberkulinempfindlichkeit stellte sich nämlich bei einem Teil der Rinder immer wieder ein, während sie bei anderen dauernd fortblieb, nachdem sie vor Beginn der Behandlung nachgewiesen worden war. Ersteres war bei Rindern der Fall, bei denen später die Sektion ausgedehntere tuberkulöse Veränderungen ergab, während Rinder mit geringfügigen Krankheitsherden auch den Alttuberkulinproben gegenüber dauernd resistent blieben. Interessant dürfte in diesem Zusammenhange die weitere Beobachtung sein, daß die Tuberkulinprobe (0,5 ccm subkutan) bei drei Rindern unserer Versuchsreihe (Nr. 1, 5, 24), die mit virulenten Perlsuchtbazillen infiziert wurden, nach erfolgter Infektion verschieden ausfiel. Rind 1 und 5 waren lange vorbehandelt worden. Rind 1 zunächst mit hohen Tuberkulindosen (ohne Antikörperbildung), Rind 5 nur mit toten Vollbakterien (3 mal 50 mg), Rind 24 hatte nur eine einmalige Injektion von nur 5 mg toter Vollbakterien erhalten. Alle drei Tiere wurden später mit demselben vollvirulenten Perlsuchtbazillenstamm intravenös infiziert. Darauf trat bei Rind 1 und 5 keine Tuberkulinempfindlichkeit ein, bei Rind 24 erfolgte nach 1 ½ Monaten eine sehr ausgesprochene Reaktion auf 0,5 ccm Alttuberkulin. Das Tier wies bei der Sektion eine ausgebreitete Tuberkulose in Lungen, Leber, Milz, Rippenfell, Bronchial-

und Mediastinaldrüsen auf. Die ziemlich gleichmäßige Größe der Tuberkel und ihre regelmäßige Verteilung in Lungen, Leber, Milz ließen keinen Zweifel darüber, daß sie auf die intravenöse Impfung mit dem virulenten Perlsuchtstamm zurückzuführen waren. Bei Rind 5 fanden sich sämtliche Organe und Drüsen frei von Tuberkulose. Die Obduktion von Rind 1 ergab nur in der rechten Lunge einen haselnußgroßen Tuberkel, alle übrigen Organe einschließlich der Drüsen erwiesen sich frei von tuberkulösen Veränderungen.

Es sind diese drei Tiere die einzigen in unserer Versuchsreihe, an denen wir eine Prüfung der durch die Vorbehandlung mit toten Vollbakterien eventuell erzielten Immunität vorgenommen haben. Das Ergebnis spricht für die Möglichkeit einer Immunisierung auf diesem Wege, die wegen der Ungefährlichkeit des Verfahrens vor anderen in der Praxis den Vorzug verdient und deshalb zu weiteren Versuchen ermutigen dürfte. Selbstverständlich sehen wir im Hinblick auf die geringe Zahl unserer Versuche von weitergehenden Schlußfolgerungen ab. Insbesondere muß es umfangreichen Untersuchungen vorbehalten bleiben festzustellen, wie oft und in welchen Dosen die Nachimpfungen mit toten Vollbakterien notwendig sind, damit ein dauernder, sicherer Schutz gewährleistet wird.

Mit gleicher Einschränkung müssen wir uns äußern über die Frage, ob den nach unserem Verfahren gewonnenen, antikörperreichen Rinder- (und Pferde-) Sera eine Schutz- und Heilkraft im fremden Organismus zukommt. Aus äußeren Gründen konnten wir diesbezügliche Versuche nicht mehr anstellen. Nach einem von uns angestellten Meerschweinchenversuch scheinen Sera, die reich an komplementbindenden Ambozeptoren und Präzipitinen sind, auf virulente Tuberkelbazillen einen Einfluß in dem Sinne auszuüben, daß sie bei längerem direkten Kontakt im Reagenzglas die Virulenz der Tuberkelbazillen herabsetzen.

Eine weitere, auf ganz anderem Gebiete liegende, praktisch wichtige Bedeutung kommt den antikörperhaltigen Tuberkulose-Sera dadurch zu, daß man mit ihnen den Gehalt von Tuberkelbazillenderivaten, z. B. den der verschiedenen Tuberkuline an spezifischer Substanz quantitativ genau feststellen kann (Ruppel und Rickmann). Es ist also möglich, sowohl durch das Komplementbindungsverfahren, als auch durch die Präzipitation mittels eines hochwertigen Tuberkulose-Serums die verschiedenen Tuberkuline im Reagenzglas vergleichsweise auszuwerten. Dabei gebührt nach unseren Erfahrungen dem Präzipitationsverfahren der Vorzug, weil es einfacher und unabhängig von wechselnden Einflüssen ist, wie sie der Komplementbindung infolge der durch das stets wechselnde Komplement ungleichen Zusammensetzung des hämolytischen Systems anhaften. Will man genaue Vergleichswerte haben zum Vergleich mit früheren Untersuchungen, so bedarf man nur eines einmal mit einem bestimmten Antigen ausgewerteten Standard-Serums. Ein solches Serum behält seinen Präzipitingehalt monatelang in unveränderter Höhe. Es kann durch Phenol-Zusatz (0,25—0,5 %) ohne Schaden an seiner spezifischen Wirksamkeit konserviert werden. Für die zu Komplementbindungsversuchen inaktivierten Sera genügt zur Keimfreiheit die Erhitzung bei der Inaktivierung allein, sofern nur die Blutentnahme vom Versuchstier und seine weitere Verarbeitung zur Serumgewinnung unter möglichst aseptischen Kautelen geschehen ist.

Wir gaben, wie schon erwähnt, bei unseren Präzipitations- und Komplementbindungsversuchen unserem T. O. I., also dem wasserlöslichen Extrakt von zermahlenden Tuberkelbazillen, den Vorzug vor anderen Antigenen. Da es eine konstante, gewichtsanalytisch exakt festgestellte Zusammensetzung hat, so eignet es sich in hervorragender Weise als Standard-Antigen zur vergleichweisen Prüfung der Tuberkuline auf ihren Gehalt an spezifischen Stoffen, andererseits auch zur Vergleichung verschiedener Immunsera auf ihren Gehalt an Antikörpern.

Schließlich sei hier noch kurz erwähnt, daß wir neben unseren Versuchen an Rindern analoge Impfungen an klinisch gesunden Pferden vorgenommen haben. Die Zahl dieser Versuche ist aber gering und berechtigt deshalb nicht zu weitgehenden Schlüssen. In je einem Versuche erzeugten sowohl Perlsuchtbazillen, die durch langjährige Austrocknung ab-

gestorben waren, als auch solche, die durch Alkohol abgetötet waren, in der Impfdosis von 50 mg, ebenso wie lebende virulente Perlsuchtbazillen in der Impfdosis von nur 5 mg, eine sehr beträchtliche Antikörpermenge im Serum des betreffenden Versuchspferdes. Diese Resultate entsprechen also den an Rindern gewonnenen. Bemerkenswert ist es, daß der Präzipitingehalt der Pferdesera höher war als der Durchschnittswert der Rindersera nach einmaliger Vorbehandlung, während die Werte des komplementbindenden Ambozeptors in den Pferde- und Rinder-Immunsera einander entsprachen.

**Zusammenfassung.** 1. Es gelingt, Rindern — und zwar sowohl tuberkulösen wie tuberkulosefreien, tuberkulinempfindlichen wie tuberkulinunempfindlichen — durch einmalige intravenöse Einspritzung toter, in ihrer Form erhaltener Tuberkelbazillen (Vollbakterien) in Dosen von 30—50 mg einen hohen Gehalt ihres Serums an spezifischen komplementbindenden Ambozeptoren und Präzipitinen zu verleihen. Je schonender die Abtötung der Tuberkelbazillen erfolgt ist, um so größer ist ihre antikörperbildende Kraft.

2. Die Bildung der experimentell erzeugten komplementbindenden Ambozeptoren und Präzipitine verläuft quantitativ nicht immer ganz parallel.

3. Ähnliche Verhältnisse wie bei Rindern scheinen hinsichtlich der experimentellen Erzeugung von Tuberkulose-Antikörpern auch bei Pferden zu bestehen.

4. Durch mehrmalige intravenöse Behandlung mit toten Tuberkelbazillen gelingt es, Rindern einen erheblichen Schutz gegen eine spätere Infektion mit lebenden vollvirulenten Perlsuchtbazillen zu verleihen.

5. Sera, die reich an komplementbindenden Ambozeptoren und Präzipitinen sind, scheinen auch auf virulente Tuberkelbazillen einen Einfluß auszuüben, indem sie bei längerem direkten Kontakt im Reagenzglas die Virulenz der Tuberkelbazillen herabsetzen.

6. Den im Anschlusse an die intravenösen Impfungen mit toten Tuberkelbazillen auftretenden Temperatursteigerungen kommt eine diagnostische Bedeutung nicht zu, weil sie unabhängig sind vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein tuberkulöser Veränderungen und vom Grade der letzteren. Sie bleiben auch bei wiederholten Einspritzungen nicht aus. Die experimentell erzeugten Antikörper gestatten aus dem gleichen Grunde wie die Temperatursteigerungen keine diagnostischen Schlußfolgerungen.

7. Mit Sera, die reich an experimentell erzeugten Tuberkulose-Antikörpern sind, kann der Gehalt von Tuberkelbazillenderivaten an spezifischen Substanzen ermittelt werden. Solche Sera eignen sich daher zur Wertbemessung der verschiedenen Tuberkulinarten durch den Reagenzglasversuch. Vorzugsweise empfiehlt sich hier die Präzipitationsmethode.