

Weitere Untersuchungen über den in vitro-Nachweis zellgebundener Antikörper bei Tuberkulose unter Berücksichtigung des Krankheitsbildes und der humoralen Antikörper gegen Tuberkulin*

H. WUTTKE, I. WUTTKE-GÖRNANDT und O. HAFERKAMP

Pathologisches Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Eingegangen am 30. September 1966

Die Tuberkulinhautreaktion ist eine Form des Nachweises einer Allergie vom verzögerten Typ gegen Tuberkulin (Übersicht bei GILLISSEN, 1965). Durch die Untersuchungen von ELVES u. Mitarb. (1963), PEARMAIN u. Mitarb. (1963), COWLING und QUAGLINO (1964), HIRSCHHORN u. Mitarb. (1964) sowie HEILMAN und McFARLAND (1965) ist bekannt, daß weiße Blutzellen von Mantoux-positiven Spendern in Zellkulturen auf Zugabe von Tuberkulin in einem bestimmten Prozentsatz eine blastenartige Umwandlung und eine Steigerung ihrer Mitoseaktivität erkennen lassen. Mit dieser Beobachtung der Übereinstimmung von Hauttest (etwa Mantoux-Test) und Verhalten der weißen Blutzellen in der Gewebekultur — also in vitro — war eine Möglichkeit geschaffen, in vitro eine gleichwertige Aussage im Hinblick auf das Vorliegen einer Tuberkulinallergie zu machen wie — in vivo — mit Hilfe der Mantoux-Reaktion. Bei früheren Untersuchungen war aufgefallen, daß Lymphocyten von aktiv Tuberkulösen eine geringere Neigung zur Umwandlung zeigten als solche Patienten mit einer ausgeheilten Tuberkulose (SCHÄFER et al., 1966). Diese Untersuchungen wurden etwa gleichzeitig von HEILMAN und McFARLAND (1966) bestätigt.

Wir waren weiter interessiert zu erfahren, inwieweit das unterschiedliche Verhalten der Blutlymphocyten in der Zellkultur unter dem Einfluß von autologem Spenderplasma und Tuberkulin klinisch-diagnostisch verwertet werden kann in dem Sinne, daß hierdurch das Vorliegen einer Allergie vom verzögerten Typ auf Grund einer Diathese sessiler Antikörper gegen Tuberkulin gewissermaßen quantitativ bestimmt wird. Diese unsere Untersuchungen führten wir an fünf Personengruppen, nämlich an gesunden, nie ernstlich an Tuberkulose erkrankten Zellspendern, die jedoch einen positiven Tuberkulinhauttest hatten, an solchen mit ausgeheilten, inaktiver Lungentuberkulose, an Spendern mit akuter Lungentuberkulose, an solchen mit chronischer, jedoch aktiver Lungentuberkulose sowie an Spendern mit extrapulmonaler Tuberkulose durch, wobei wir bei dieser orientierenden Untersuchung bewußt Einzelheiten des klinischen Bildes außer acht ließen. Zweitens sind wir dabei der Frage nachgegangen, ob die in der früheren Arbeit (SCHÄFER et al., 1966) beschriebene Hemmung der durch Tuberkulinzugabe veranlaßten blastenartigen Transformation von Lymphocyten durch das — hier autologe — Plasma von Patienten mit aktiver Tuberkulose auf einen gegen Tuberkulin gerichteten humoralen Antikörper zurückzuführen ist.

* Mit Unterstützung aus Mitteln „Förderung der Krebsforschung“ des Herrn Kultusminister des Landes Nordrhein-Westfalen.

Material und Methodik

Leucocyten- und Serumpspender. Von 61 Personen, unterteilt in fünf Versuchsgruppen, untersuchten wir das Verhalten der weißen Blutzellen in der Zellkultur nach Zugabe von Tuberkulin. Alle Personen wiesen einen positiven Mantoux-Hauttest auf, wobei gereinigtes Tuberkulin GT (Hoechst) in der Dosierung von 1 IE bis höchstens 100 IE verwendet wurde. 7 Personen waren klinisch und röntgenologisch gesund und nie ernstlich an Tuberkulose erkrankt gewesen (Versuchsgruppe 1), 5 wiesen eine ausgeheilte Lungentuberkulose auf (Versuchsgruppe 2). 14 Personen waren an einer frischen, meist exsudativen Lungentuberkulose erkrankt (Versuchsgruppe 3). 32 Patienten zeigten eine alte, über Monate verlaufende chronisch-cirrhotische Lungentuberkulose (Versuchsgruppe 4). Bei 3 Patienten lag eine extrapulmonale Tuberkulose vor (Versuchsgruppe 5). Diesen 61 Personen wurde zur Leukocyten-gewinnung 20 ml Venenblut mit einer Stahlkolbenspritze, die vorher mit Hepatin ausgespült worden war, und gleichzeitig 10 ml Venenblut zur Gewinnung von Serum entnommen.

I. Invitro-Nachweis zellgebundener Antikörper gegen Tuberkulin in der Gewebekultur

2 ml mit 5000—8000 weißen Blutzellen angereicherten autologen Spenderplasmas aus jeweils 20 ml Venenblut wurde zusammen mit 8 ml Gewebezüchtungsmedium TCM 199 (Difco) in Kulturflaschen gegeben, die mit je 10 Deckgläschen ausgelegt waren. Von jedem Probanden wurden 2 Kulturflaschen angelegt, wobei einer Flasche als Leerversuch kein Antigen und der anderen Flasche 10 IE GT/ml Tuberkulin zugegeben wurde. Der Kulturversuch verlief bei 37° im Wärmeschrank über 4 Tage. Am 1., 3. und 4. Tag wurden jeweils 2 Deckgläschen entnommen und nach PAPPENHEIM gefärbt. (Genaue Technik der Kulturen wie bei SCHÄFER et al., 1966.)

Auswertung der Kulturen. Als Maß für die Reaktion der weißen Blutzellen in der Zellkultur haben wir 4000 lymphoide (rundkernige) Zellen ausgezählt und die Zahl der Mitosen und blastenartigen Transformationen dieser Zellformen im Prozentsatz bestimmt. Die umgewandelten Lymphocyten sind durch einen locker strukturierten, etwas eosinophilen Kern mit meist einem, manchmal auch 2—3 runden, etwas dichteren Nucleolen und ein tief basophiles Plasma gekennzeichnet.

II. Nachweis gegen Tuberkulin gerichteter humoraler Antikörper mittels des passiven Hämagglutinationstestes nach BOYDEN in der Modifikation von STAVITZKI

Das nach Defibrination mit Glasperlen aus den 10 ml Venenblut gewonnene Serum wurde bei 56° im Wärmebad (30 min) inaktiviert und dann zweimal mit Hammelerythrocyten (10 Teile Serum/1 Teil dichtgepackte Hammelerythrocyten) absorbiert, um Normalantikörper gegen Hammelerythrocyten auszuschalten. Von dem so behandelten Serum haben wir dann je drei Verdünnungsreihen mit physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2) beginnend mit einer Verdünnung von 1:2 und fortlaufend bis zu einer solchen von 1:1024 hergestellt. In die erste Reihe wurde je ein Tropfen (0,05 ml) einer 2,5%igen Hammelerythrocyten-suspension gegeben (Kontrolle 1). In die zweite Reihe gaben wir je einen Tropfen einer 2,5%igen Erythrocytensuspension von tanniern Hammelblutkörperchen (Kontrolle 2). Zur Herstellung der tanniern Hammelerythrocyten nahmen wir eine 2,5%ige Erythrocyten-suspension und jeweils die gleiche Menge einer 1:20000 verdünnten Tanninlösung (Merck) und ließen diese Mischung 10 min bei 37° im Wasserbad stehen. Anschließend wurden die Erythrocyten dreimal gewaschen und in die Ausgangskonzentration zurücküberführt. In die dritte Reihe wurde je ein Tropfen der mit dem Antigen beladenen, wie bei Kontrolle 2 tanniern Erythrocyten gegeben (Hauptversuch). Zur Herstellung dieser sensibilisiern Erythrocyten nahmen wir tannierte Hammelblutkörperchen und ließen 2 Std bei 37° im Wasserbad eine Tuberkulinlösung (1 mg-%) auf sie einwirken. Danach wurden die Hammelerythrocyten dreimal gewaschen und die Erythrocytensuspension in die Ausgangskonzentration zurückgeführt. Die Röhrchen blieben 12 Std im Kältschrank stehen. Anschließend wurde die Stärke der Agglutination und die Serumverdünnung, bis zu welcher eine Agglutination vor-

lag, abgelesen und als Titer angegeben; bei Kontrolle 1 oder 2 lag in keinem Falle ein höherer Titer als im Hauptversuch vor. Im übrigen entsprachen die methodischen Einzelheiten den Angaben von HAFFERKAMP et al. (1963).

Ergebnisse

I

Die weißen Blutzellen zeigen nach 24 Std in allen Kulturen ein gleichförmiges Bild. Die kleinen, typischen Lymphocyten sind nur noch in geringer Zahl vorhanden. Das Bild beherrschen größere, lymphocytenähnliche, rundkernige Zellen mit einem hellen, breiten Cytoplasmasaum. Die neutrophilen Granulocyten sind als solche zwar noch zu erkennen, verlieren aber ihre scharfen Zellgrenzen und zeigen Übersegmentierungen und Kernpyknosen. Bei allen Kulturen, denen kein Tuberkulin zugegeben wurde, bleibt das morphologische Geschehen auch über die folgenden Tage gleichförmig. Unterschiede im Verhalten der Lymphocyten zeigen sich am 3. und 4. Tage der Zellkultur, wenn der Zellspender einen positiven Mantoux-Hauttest aufwies und dem Kulturmedium Tuberkulin zugesetzt worden war. Einzelne Lymphocyten haben sich am 3. Tage zu blastenartigen Zellen umgewandelt oder befinden sich in Mitose.

Tabelle 1. *Leukocytenkulturen aller untersuchten Personen mit einem positiven Mantoux-Hauttest bei 100 und weniger IE Tuberkulin GT*

Züchtungsmedium: 8 ml TCM 199 (Difco), 2 ml autologes Plasma, 100 IE Tuberkulin GT pro ml Medium.

Personen	Anzahl	% blastenartig umgewandelte Zellen (% in Mitose befindlicher Zellen)
gesund: Gruppe 1: keine Erkrankung an Tuberkulose bekannt	7	1,2—2,6 (0,1—0,4)
Gruppe 2: geheilte Lungentuberkulose	5	4,8—8,6 (0,3—1,1)
erkrankt: Gruppe 3: frische Lungentuberkulose	14	0,2—1,6 (0—0,1)
Gruppe 4: chronische, jedoch noch aktive Lungentuberkulose	32	1,2—3,6 (0,1—0,6)
Gruppe 5: frische extrapulmonale Tuberkulose	3	3,7—8,7 (0,5—0,7)

Die zahlenmäßige Auswertung dieser Kulturen zeigt (s. Tabelle 1), daß in der Versuchsgruppe 1, also jenen Personen, die nie ernstlich an einer Tuberkulose erkrankt waren, die Werte für die blastenartig umgewandelten Lymphocyten zwischen 1,2% und 2,6% (Mitosen zwischen 0,1% und 0,4%) liegen. Bei der Versuchsgruppe 2, d.h., den Personen mit ausgeheilter Tuberkulose, variieren diese Zahlen zwischen 4,8% als der unteren Grenze und 8,6% als der oberen Grenze transformierter Zellen (zwischen 0,3% und 1,1% Mitosen).

In der Versuchsgruppe 3 (Patienten mit einer frischen, pulmonalen Tuberkulose) ergibt sich eine Variationsbreite blastenartig umgewandelter Lymphocyten von 0,2—1,6% (zwischen 0—0,1% Mitosen). Bei der Versuchsgruppe 4, Patienten mit einer alten, jedoch noch aktiven Tuberkulose, verteilt sich die Transformationsrate von 1,2—3,6% (Mitosen von 0,1—0,6%).

Die drei Patienten (Versuchsgruppe 5) mit einer frischen, extrapulmonalen Manifestation des tuberkulösen Krankheitsgeschehens zeigten Werte transformierter Lymphocyten zwischen 3,7% und 8,7% (0,5—0,7% Mitosen), wobei eine Patientin mit der Umwandlungsrate von 3,7% noch zusätzlich einen alten, jetzt reaktivierten Lungenprozeß hatte. Die pulmonalen Prozesse bei den beiden anderen Patienten dieser Gruppe waren inaktiv.

II

Die Bestimmung der gegen Tuberkulin gerichteten Antikörper im Serum ließ nur in zwei Fällen, und zwar bei Versuchsgruppe 4 (alte, noch aktive Lungentuberkulose) eine Titerhöhe von 1:512 und 1:256 aufdecken, wohingegen bei Versuchsgruppe 1 und 2 praktisch keine Titer vorhanden waren. Die Mehrzahl der

Tabelle 2. *Verteilung der Titerhöhe der gegen Tuberkulin gerichteten humoralen Antikörper bei den Gruppen 3, 4 und 5. (Angabe der Zahl der Patienten)*

	Titerhöhe									
	Ø,	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Gruppe 3: Frische Lungentuberkulose	1	1	4	—	—	6	—	2	—	—
Gruppe 5: frische extrapulmonale Tuberkulose	1	1	—	—	—	—	1	—	—	—
Gruppe 4: alte Lungentuberkulose	8	1	3	4	5	5	4	—	1	1

Tabelle 3. *Gegenüberstellung von Titerhöhe der gegen Tuberkulin gerichteten Antikörper im Serum und dem Prozentsatz blastenartig umgewandelter Zellen der entsprechenden Zellspender*

Titerhöhe	Ø	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
% blasten-	1,3	1,9	0,3	1,7	1,5	0,6	1,2	1,0	1,1	1,1	—
artig um-	1,4	6,9	0,9	2,4	1,6	1,0	1,3	—	—	—	—
gewandelter	1,8	—	1,2	2,7	2,2	1,5	1,7	—	—	—	—
Zellen	2,2	—	1,7	3,8	2,9	1,6	2,9	—	—	—	—
	3,1	—	—	—	2,8	1,6	3,2	—	—	—	—
	3,1	—	—	—	6,2	1,2	—	—	—	—	—
	3,7	—	—	—	6,3	1,8	—	—	—	—	—
	8,3	—	—	—	6,8	3,3	—	—	—	—	—

untersuchten Seren von den Gruppen 3—5 zeigte eine Titerhöhe von 1:4 bis 1:32 (s. Tabelle 2). Bei 10 von 49 Patienten der drei Gruppen ließen sich keine humoralen Antikörper gegen Tuberkulin nachweisen. Für eine bestimmte Versuchsgruppe charakteristische Konstanz der Titerhöhe war nicht feststellbar, wie schon allein aus Tabelle 2 hervorgeht. In Tabelle 3 sind die Titerhöhen der verschiedenen Seren dem Prozentsatz der blastenartigen Transformation der Lymphocyten des entsprechenden Spenders gegenübergestellt. Danach kann man bei Fällen ohne — mit der passiven Hämagglutination — nachweisbare humorale Antikörper gegen Tuberkulin sowohl hohe als auch niedrige Umwandlungsraten der Lymphocyten finden, und zwar in etwa in der gleichen Verteilungsbreite wie bei den Fällen mit geringem oder hohem Antikörpergehalt im Serum. Eine irgendwie geartete Beziehung zwischen mitose- und blastenartiger Umwandlungsrate

der Lymphocyten und dem Titer der passiven Hämagglutination — als Ausdruck der Anwesenheit von humoralen Antikörpern gegen Tuberkulin — besteht also nicht.

Diskussion

Überblickt man die hier mitgeteilten Ergebnisse einer Beobachtung von Lymphocyten, die von Spendern mit einem positiven Mantoux-Hauttest gewonnen waren in der Zellkultur, so zeigt sich wieder, daß sich nur dann ein Teil der Zellen umwandelt, wenn dem autologes Spenderplasma enthaltenden Kulturmedium Tuberkulin zugesetzt war. Ein Vergleich der Versuchsgruppe 3 und 4 (frische und chronisch-aktive Tuberkulose) mit der Versuchsgruppe 2 (ausgeheilte, inaktive Tuberkulose) zeigt die deutlich stärkere Proliferationsneigung der Lymphocyten von Spendern mit ausgeheilter Lungentuberkulose gegenüber solchen mit aktiver Lungentuberkulose. Durch Austausch von Lymphocyten und Plasma verschiedener Spender in Zellkulturen von geheilten und noch erkrankten Tuberkulosepatienten hatten kürzlich SCHÄFER et al. (1966) hierfür einen „Hemmfaktor“ im Plasma aktivtuberkulöser Patienten verantwortlich gemacht, dessen Anwesenheit eine geringere Zahl umgewandelter blastenartiger Zellen bedingt. Diese Beobachtungen waren auch von HELMAN und MCFARLAND (1965, 1966) gemacht worden.

Weiter zeigen die vorliegenden Untersuchungen, daß die Proliferationsneigung von Lymphocyten gesunder, nie ernstlich an Tuberkulose erkrankter Personen in etwa mit der frisch an Tuberkulose erkrankten Personen übereinstimmt, was offenbar für letztgenannte Gruppe auf der Anwesenheit des Hemmfaktors und für die ersterwähnte Gruppe auf einer mangelhaft ausgebildeten Allergie vom verzögerten Typ gegen Tuberkulin beruht. Die höchsten Werte umgewandelter Lymphocyten erreichten die Personengruppen mit ausgeheilter Tuberkulose (Gruppe 2) und Patienten mit einer frischen extrapulmonalen Tuberkulose (Gruppe 5) bei altem, inaktiven Lungenprozeß. Etwa in der Mitte zwischen beiden Extremen liegen die Umwandlungsraten der Lymphocyten von Patienten mit einer alten, jedoch noch aktiven Tuberkulose.

Es lassen sich also vorerst für den Kliniker schon aus den vorliegenden Befunden folgende Hinweise erzielen: 1. Eine sehr niedrige Proliferationsrate der Lymphocyten nach Tuberkulinzusatz ist bei dem klinischen Verdacht einer Tuberkulose mit dem Bild einer frischen Erkrankung vereinbar. 2. Eine sehr hohe Proliferationsrate spricht bei dem Ausschluß einer extrapulmonalen Tuberkulose für eine in Abheilung befindliche Erkrankung. 3. Eine mittlere Proliferationsrate weist auf eine Aktivität des tuberkulösen pulmonalen Krankheitsgeschehens hin. Dabei muß für diese Aussagen als Bedingung gelten, daß die Kulturen mit autologem Plasma angesetzt sind.

Vorerst bestehen keine sicheren Zusammenhänge zwischen der Titerhöhe der mittels passiver Hämagglutination nachgewiesenen humoralen Antikörper gegen Tuberkulin und der — auf der Anwesenheit von sessilen Antikörper beruhenden — Stärke der Proliferationsrate und Mitosehäufigkeit der Lymphocyten. Darüber hinaus konnten wir aus den vorliegenden Untersuchungen auch keine Beziehungen der im Serum nachweisbaren humoralen Antikörper gegen Tuberkulin zum klinischen Bild der Erkrankung aufdecken, wie es auch von BRODHAGE (1954) betont wurde.

Zusammenfassung

In Kulturen weißer Blutzellen von 61 Personen mit positivem Mantoux-Hauttest wird der Prozentsatz blastenartig umgewandelter, lymphoider Zellen und deren Mitosen nach Zugabe von Tuberkulin GT und autologem Plasma bestimmt. Außerdem wird von den gleichen Personen das Serum auf humorale Antikörper gegen Tuberkulin mittels der passiven Hämagglutination (Boyden) untersucht. Die gesunden, nie auffällig an Tuberkulose erkrankten Personen sowie Patienten mit einer frischen (offenen) Lungentuberkulose weisen eine geringe Zahl umgewandelter Zellen und nur wenige Mitosen in der Kultur auf, während Personen mit einer inaktiven, ausgeheilten Tuberkulose und die mit einer frischen, extrapulmonalen Tuberkulose bei inaktivem, alten Lungenprozeß einen hohen Prozentsatz umgewandelter Zellen mit höherer Mitoserate erkennen lassen. Der Prozentsatz der umgewandelten Lymphocyten von Patienten mit einer alten, aktiven Tuberkulose liegt in der Mitte zwischen den beiden vorher genannten Extremen. Die Höhe der Titerstufen bei der serologischen Untersuchung auf humorale Antikörper gegen Tuberkulin ergibt keine Beziehungen zu dem Prozentsatz der blastenartigen Umwandlung der Lymphocyten und ihrer Mitoserate in der Kultur nach Zugabe von autologem Plasma und Tuberkulin.

Further Investigation of the In Vitro Proof of Cell-Bound Antibody in Tuberculosis with Respect to the Clinical Picture and Humoral Antibodies Against Tuberculin

Summary

After addition of Tuberculin GT and autologous plasma, the percentage of lymphoid cell blast forms and their rate of mitosis were determined by tissue culture of the leucocytes of 61 people who gave a positive reaction to the Mantoux Skin Test. In addition, the sera of the same group of people were examined with the Boyden Hemagglutination Test for the presence of humoral antibodies. People free from tuberculosis as well as those with active (contagious) pulmonary tuberculosis showed only a small percentage of lymphoid cells that had undergone transformation to blast forms and an equally small number of mitotic forms. On the other hand, patients with inactive, healed tuberculous lesions and those with recently acquired extrapulmonary tuberculosis with old, inactive tuberculous lesions of the lung produced a high percentage of lymphoid cell blast forms and a higher rate of mitosis. The percentage of lymphoid blast forms in cultures of the leucocytes of patients with old, active tuberculosis lay somewhat between the described two extremes. No correlation was found between the results of the serological investigation for humoral antibodies against tuberculin and the percentage of lymphoid cells transformed to blast forms nor their rate of mitosis.

Literatur

- BRODHAGE, H.: Die Hämagglutinationsreaktion nach MIDDLEBROOK und DUBOS. *Ergebn. Immun-Forsch.* **12**, 123 (1954).
 COWLING, D. C., and D. QUAGLINO: Effect of antigen mixtures on blastic transformation in leucocyte cultures. *Lancet* **1964I**, 117.
 ELVES, M. W., S. ROATH, and M. C. G. ISRAELS: The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro. *Lancet* **1963I**, 806.
 GILLISSEN, G.: Immunologische Grundlagen der allergischen Spätreaktion. *Klin. Wschr.* **43**, 590—597 (1965).

- HEILMAN, D., and W. MCFARLAND: Inhibition of tuberculin-induced mitogenesis in lymphocyte cultures by serum from tuberculous donors. *Fed. Proc.* **24**, 182 (1965).
- — Inhibition of tuberculin-induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculous donors. *Int. Arch. Allergy* **30**, 58—66 (1966).
- HIRSCHHORN, K., R. L. KOLODNY, N. HASHEM, and F. BACH: Mitogenic action of phytohemagglutinin. *Lancet* **1963 II**, 305.
- PATERSON, P. Y., and M. HARVIN: Suppression of allergic encephalomyelitis in rats by means of antibrain serum. *J. exp. Med.* **117**, 755—774 (1963).
- PEARMAN, G. R., R. LYCETTE, and R. H. FITZGERALD: Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes. *Lancet* **1963 I**, 637.
- SCHÄFER, H., H. WUTTKE u. O. HAFERKAMP: Über den Nachweis zellgebundener Antikörper in vitro. *Virchows Arch. path. Anat.* **341**, 133—141 (1966).

Dr. med. H. WUTTKE
Dr. med. I. WUTTKE-GÖRNANDT
Prof. Dr. med. O. HAFERKAMP
Pathologisches Institut der Universität
53 Bonn, Venusberg