Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten der Universität in Bern. (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle.)

Ist die Methode der Komplementbindung beim Nachweis spezifischer Stoffe für Hundswut und Vaccine brauchbar?

Von Privatdozent Dr. O. Heller und Dr. E. Tomarkin.

Der Bordet-Gengousche Versuch ist für den Nachweis spezifischer Antikörper in Immunseren einerseits und zur Ermittlung ihrer Menge und für den Nachweis der Antigene andererseits von Bedeutung geworden, nachdem Wassermann eine sichere Methodik für diese Versuchsanordnung geschaffen hatte. Der Fortschritt liegt in der Benutzung von klaren, zellfreien Bakterienextrakten an Stelle der von Bordet angewandten Bakterienemulsion. In dieser Beziehung sind die ausgedehnten Experimente zum Nachweis der Syphilis-Antigene sowie die Bindungsversuche bei malignen Tumoren zum Zwecke der Diagnose pathologischer Prozesse von hervorragendem Interesse. Aber auch zur Systematisierung von Krankheitserregern ist die Komplementbindung versuchsweise herangezogen worden.

Wassermann, Neisser, Bruck und Schucht haben bei der Syphilis des Menschen und Affen durch Komplementverankerung für Lues spezifische Substanzen nachweisen können, und zwar im Blute des kranken Menschen und Tieres, im Serum des immunisierten Tieres, in Extrakten syphilitischer Krankheitsprodukte und Krankheitsherde aller Stadien, ja sogar in der Lumbalflüssigkeit von Patienten, welche an progressiver Paralyse und Tabes dorsalis litten. Auf Grund ihrer zahlreichen Experimente kommen die Autoren zu dem Schluß, daß bei Vermeidung der vielfachen Fehlerquellen die Methode zwar für den Praktiker nicht reif ist, aber in der wissenschaftlichen Prüfung eindeutige und zuverlässige Resultate gibt und „daß man in manchen Fällen bei Lues auf serodiagnostischem Wege mittels der spezifischen Komplementbindung eine spezifische Reaktion erhalten kann“.

Da im hiesigen Institut während des letzten Jahres unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Kolle umfangreiche Untersuchungen über die Verwertbarkeit der Komplementbindung beim Studium von Krankheitserregern, Schutzimpfung und Immunserum auf breiter Grundlage angestellt wurden, mögen den bisherigen in der Literatur erschienenen Mitteilungen die folgenden experimentellen Erfahrungen in kurzen Zügen angereicht werden, welche bei Studien über Lyssa und Vaccine gewonnen sind. Die Infektionserreger sind bei beiden unbekannt. Wir besitzen noch keine Methode, um spezifische Giftstoffe bei diesen Krankheiten experimentell nachzuweisen; so hatten z. B. Heller und Bertarelli in Anwendung der verschiedensten Methoden den Nachweis für Lyssa von spezifischen toxischen Substanzen angestrebt, ohne indessen konstante Resultate zu erhalten. Es lag deshalb für uns nahe, mittels der neuen Methodik den Nachweis spezifischer Stoffe zu versuchen.

I. Versuche mit Lyssa.

Die Faktoren, deren Zusammentreffen eine Komplementverankerung bedingen, sind genügend bekannt. Während Wassermann, Neisser, Bruck und Schucht beim Studium der Lues in dem unseren Experimenten analogen Teil Immunsera verwendeten, die durch Injektion von Extrakten aus luetischen Foeten, Organen, Blut, Organemulsionen gewonnen waren, also neben ihrem nachgewiesenen Gehalt an spezifisch-luetischen Antikörpern gleichzeitig polycytolytisch genannt werden müssen, während ferner diese Sera in Mischung mit obigen Extrakten untersucht wurden und sonach die Vorbedingungen für störende Präzipitationsprozesse sehr zahlreich waren, lagen die Verhältnisse für die Experi-

mente mit Hundswutsubstanzen wesentlich günstiger. In erster Linie ist die Beschaffung des Materials, das den Hundswut-erreger in Reinkultur enthält, Gehirn und Rückenmark an Wut verendeter Tiere, auch in großen Mengen nicht allzu schwierig; andererseits ist man ganz nach Analogie der Syphilisversuche zwar auch genötigt, den Erreger mitsamt dem Gewebe bei der Immunisierung zu injizieren, jedoch mit dem Vorteil, daß man nur eine Gewebsart (von den ganz minimalen Mengen Blut und event. Bindegewebe ist abzusehen) dem Immuntier einverleibt. Die für den Nachweis der Komplementverankerung so hinderliche Niederschlagsbildung erscheint demnach beim Experimentieren mit Lyssamaterial im Gegensatz zu Lues wesentlich beschränkt.

Zur Herstellung eines Lyssa-Immunserums wurden Kaninchen subcutan mit Rückenmarkemulsionen der mit Virus fixe getöteten Wuttiere behandelt, und zwar erhielten die Immunisierungstiere eine Einspritzung an 24 aufeinanderfolgenden Tagen mit Marksorten, die acht bis zwei Tage getrocknet waren. In einzelnen Fällen wurde die Zahl der Injektionen bis zu 36 gesteigert. Mit Rücksicht auf die von R. Kraus über die Produktion der Antikörper bei Hundswut gemachten Angaben wurde die Prüfung des Immunserums frühestens zwei bis drei Wochen nach der letzten Injektion vorgenommen. Bei dieser Prüfung der Immunsera auf spezifische Antikörper diente als Testflüssigkeit Preßsaft aus Lyssagehirnen von Kaninchen, die an Wut verendet waren (Virus fixe und Straßenvirus — jedes für sich). Ueber die Präparation des Preßsaftes finden sich bei Heller (Schutzimpfung gegen Lyssa) die nötigen Angaben. Solcher bei 350 Atmosphären gewonnene Saft wurde für die Bindungsversuche völlig klar zentrifugiert, möglichst frisch, in der ersten Hälfte der Versuche mit einem ganz geringen Phenolzusatz, später völlig rein benutzt. Wir überzeugten uns experimentell, daß die Inaktivierung des Preßsaftes nicht nötig ist; denn weder allein, noch zusammen mit inaktiviertem hämolytischem Serum veranlaßte er eine Hämolyse. Dagegen ist übereinstimmend mit den Erfahrungen bei syphilitischen Extrakten, bei Bakterienaggressinen etc. zu konstatieren, daß der Preßsaft an sich eine komplementbindende Wirkung besitzt, sodaß bei Anwendung einer doppelt hämolytischen Dosis haem. Serums auf 1 ccm 5 %iger Hammelblutkörperchen = Aufschwemmung plus 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement bei Zusatz von 0,5 ccm Preßsaft eine deutliche Trübung bestehen bleibt (kleine Kuppe), ja die Hämolyse auch bei fallenden Mengen Preßsaft (0,3, 0,1, 0,05, 0,03, 0,01) in keinem Fall komplett wird. In den vielfach wiederholten und abgeänderten Versuchsreihen kam der Preßsaft zur Verwendung in Quantitäten von 0,3, 0,2 und 0,1 ccm, und zwar derart, daß mit dem gleichen Saft die sämtlichen Kombinationen (cf. unten) in Serien durchgeprüft wurden. — Das Immunserum wurde möglichst bald nach der Blutentnahme, die, wie oben erwähnt, zwei bis drei Wochen nach der letzten Injektion zum erstenmal vorgenommen wurde, abpipettiert, klarzentrifugiert, ohne Zusatz abgefüllt, abgeschmolzen und in diesem Zustand eine Stunde bei 56° inaktiviert.

Bei den Versuchen mit selbsthergestelltem Serum wurde möglichst frisches Serum angewendet; außerdem verdanken wir der Liebesswürdigkeit des Herrn Dr. Marie, Institut Pasteur in Paris, Hundswut-Immunserum, dessen Herstellung und Aufbewahrung natürlich von obigen Prinzipien abweicht. Das Mariesche Serum, von Hammeln gewonnen, hat bekanntlich (cf. Marie, Recherches sur le Serum antirabique, Annal. de l'Inst. Pasteur 1905, Janvier, No. 1) in vitro auf Emulsionen von Wutvirus rabizide Wirkung, sodaß die Verimpfung von Emulsionen, die dem Einfluß des Serums längere Zeit ausgesetzt waren, bei Kaninchen keine Wut mehr hervorbringt; daß diese Wirkung durch die Gegenwart spezifischer Immunstoffe bedingt ist, geht u. a. daraus hervor, daß ein Immunserum, welches längere Zeit mit Virusemulsion in Kontakt war und dann durch Zentrifugierung gewonnen wurde, keine rabiziden Eigenschaften mehr besitzt. Die spezifischen Antikörper haben sich nämlich während des Kontakts auf die in der Emulsion vorhandenen Wuterreger fixiert.

Bei der Anstellung der äußerst empfindlichen Bindungs-experimente verdienen eine ganz besondere Beachtung die Kontrollproben. Es sei nur erwähnt, daß jede Substanz allein, mit Komplement, mit hämolytischem Serum, mit den letzten beiden zusammen und schließlich alle gebrauchten Sera und Preßsäfte in korrespondierendem Wechsel in ihrer Wirkung auf Blutkörperchen zu prüfen sind. Auch wurden zur Kontrolle der Reagentien und Arbeitenden mit den gleichen Blutkörperchen, hämolytischem Serum, Kochsalzlösung, Komplement, Gläsern etc. Serien ausgeführt mit Meningococcenserum und Meningococcenaggressin, sowie Pestserum und Pestaggressin, sowie diese Substanzen allein und wechselseitig

bezüglich ihrer hemmenden, präzipitierenden und hämolytischen Eigenschaften geprüft.

Als hämolytisches System diente ein Kaninchenserum, das durch Immunisierung mit Hammelblut hergestellt war; einige Proben wurden auch mit Ziegenblut-Kaninchenserum und Ziegenblut vorgenommen. Das Komplement wurde sowohl von Meerschweinchen wie Kaninchen benutzt und in verschiedenen Mengen zugesetzt. Uebrigens wurden auch hierdurch keine positiven Resultate erzielt.

Die Blutkörperchen sollen unbedingt frisch von einem gesunden Tier entnommen, mindestens zweimal in 0,85 %iger Kochsalzlösung (Aq. dest. + Natriumchlorid chemisch rein) gewaschen und alsdann in 5 %iger Konzentration aufgeschwemmt sein. Der Zusatz des hämolytischen Serums, dessen Titre ja nicht zu niedrig liegen darf, da sonst abermals Präzipitationen oder Umsetzungen hinderlich werden, erfolgte in doppelt hämolytischer Dosis teils im voraus zur Blutemulsion (sensibilisierte Blutkörperchen), oder Blut und hämolytisches Serum wurden getrennt, kurz nacheinander jedem Röhrchen zugefügt, eine Modifikation, die für den Ausfall der Versuche mit Hundswutmaterial gleichgültig erscheint. Daß Gläser, Pipetten, Kochgeschirr, sterilisiert sauber in physiologischer NaCl-Lösung ausgekocht sein müssen, sei nebenbei bemerkt.

Bei dem im ganzen negativen Ausfall der zahlreichen Proben erscheint es zweckmäßig, nur eine große Versuchsreihe mit sämtlichen Kontrollproben wiederzugeben, wie sie in prinzipiell gleicher Anordnung mit andern Wutimmunseren und Preßsäften zahlreich wiederholt wurden.

Tabelle.

A.

Preßsaft pro Röhrchen 0,2 ccm Kaninchenkomplement 0,05 ccm. 5 % Hammelblut, 1 ccm + doppelte hämolytische Dosis und ergänzt auf die gleiche Flüssigkeitsmengequantität.

I.

Lyssaimmunserum + Lyssapreßsaft (Straßenvirus).

Lyssaimmunserum Bern.	Resultat.
0,5	Keine Hämolyse
0,3	" "
0,1	" "
0,05	Geringe Hämolyse
0,03	" "
0,01	Deutliche Hämolyse.

II.

Wie I, aber mit Preßsaft von Virus fixe.

Lyssaimmunserum Bern.	Resultat.
0,5	Keine Hämolyse
0,3	" "
0,1	" "
0,05	Geringe Hämolyse
0,03	Deutliche Hämolyse
0,01	Starke Hämolyse.

III.

Wie I, jedoch statt Lyssapreßsaft Preßsaft aus dem Gehirn normaler Kaninchen.

Lyssaimmunserum Bern.	Resultat.
0,5	Keine Hämolyse
0,3	" "
0,1	" "
0,05	Deutliche Hämolyse
0,03	" "
0,01	" "

IV.

Wie III, jedoch statt Immunserum inaktiviertes Normalkaninchenserum.

Normalserum.	Resultat.
0,5	Geringe Hämolyse
0,3	Starke Hämolyse
0,1	" "
0,05	" "
0,03	" "
0,01	" "

V.

Wie IV, aber statt Normalpreßsaft Preßsaft von Straßenvirus.

Normalserum	Resultat.
0,5	Spur von Hämolyse
0,3	Deutliche Hämolyse
0,1	" "
0,05	" "
0,03	" "
0,01	" "

VI.

Wie IV, aber statt Normalpreßsaft Preßsaft von Virus fixe.

Normalserum	Resultat.
0,5	Deutliche Hämolyse
0,3	" "
0,1	" "
0,05	" "
0,03	" "
0,01	" "

B.

Preßsaft pro Röhrchen 0,4 ccm, sonst wie A.

VII—XII.

Entsprechend I—VI, aber stets 0,4 ccm Preßsaft. Resultat nicht wesentlich verändert, die Hämolyse ganz allgemein etwas stärker.

XIII—XVIII.

Entsprechend den Reihen I—III und VII—X, aber stets statt Berner Immunsorum Hundswutimmunsorum von Paris (Dr. Marie). Im allgemeinen die gleichen negativen Resultate wie oben.

XIX.

Kontrollproben der in I—XVIII verwendeten einzelnen Substanzen und ihrer Kombinationen:

Stets 0,5 ccm der Kontrollflüssigkeit.

1. Berner Lyssaimmunserum + 1 ccm Blut (5 %). Keine Hämolyse.
2. " " + 1 " " + Hämolsin. Keine Hämolyse.
3. Berner Lyssaimmunserum + Blut + Komplement. Spur.
4. " " + " + " + Hämolsin. komplett.
- 5—8. Pariser Immunsorum, sonst wie 1—4. Resultat wie 1—4.
- 9—12. Normalserum, sonst wie 1—4. Resultat wie 1—4.
- 13—16. Lyssapreßsaft (Virus fixe), sonst wie 1—4, Resultat wie 1—3, auch bei 16 gewisse Hemmung.
- 17—20. Lyssapreßsaft, Straßenvirus, sonst wie 1—4, Resultat wie 13—16.
- 21—24. Normalpreßsaft, sonst wie 1—4. Resultat wie 13—16.
25. Blut + Komplement. Keine Hämolyse.
26. Blut allein. Keine Hämolyse.
27. Blut + Hämolsin. Keine Hämolyse.
28. Blut + Hämolsin + Komplement. Komplette Lösung.

In solcher Anordnung wurden die Versuche sehr oft wiederholt, hier und da auch mit abgeänderten Mengenverhältnissen der Preßsäfte. Im Vergleich zu den Experimenten von Wassermann, Neisser etc. hat die Prüfung nach obigem Muster den Vorteil, daß die zu untersuchenden Sera jedes für sich in sechs verschiedenen Konzentrationen zur Anwendung kam, sodaß eine etwa durch Nebenumstände bedingte Komplementverankerung nicht verkannt werden kann, da sie sich vorzugsweise durch Störung der graduell absinkenden Reaktion bemerkbar machen würde. Bezüglich der Technik ist noch beizufügen, daß die abgestuften Mengen spezifischer Substanzen stets auf eine gleiche Flüssigkeitsquantität (0,85 % NaCl-Lösung als Zusatz) aufgefüllt, nach gründlicher Mischung während einer Stunde bei 37° gehalten wurden. Die Beobachtung der Reaktion geschah abermals nach einstündigem Aufenthalt im Brutschrank und stets ein zweites Mal nach zwölfstündigem Aufenthalt der Röhrchen im Eisschrank. Es sei bemerkt, daß man hier und da bezüglich der Hämolyse gut abgestufte Reaktionsreihen erhalten kann; jedoch tritt eine so regelrechte Komplementbindung durchaus nicht gesetzmäßig ein.

Fassen wir nun die Ergebnisse der zahlreichen, von uns mit allen Kautelen und Kontrollen angestellten Versuchsreihen zusammen, so gelangen wir zu folgendem Urteil:

Bisweilen ergaben sich in den mit Immunsorum hergestellten Versuchsreihen mit spezifischen Preßsäften abgestufte Hemmungen der Hämolyse. Doch wurden in gleicher Weise sich abstufoende Hemmungen auch erzielt, bei der Mischung von Immunsorum in fallenden Dosen mit Preßsaft, der aus den Gehirnen normaler Kaninchen gewonnen war.

Im Gegensatz hierzu ergab Normalserum mit den verschiedenen Preßsäften diese Hemmung nicht.

II. Versuche mit Vaccine.

Unter Berücksichtigung der eben geschilderten Kautelen wurden neben den Experimenten mit Lyssamaterial Versuchsreihen mit Impfpockensubstanzen vorgenommen. Während die Untersuchungen über diesen Gegenstand im Gange waren, teilte Jobling Resultate gleicher Experimente mit (The occurrence of specific immunity principles in the blood of vaccinated calves. Journ. of exp. Med. Bd. 8, No. 6). Jobling verwendete Serum geimpfter und normaler Kälber gegenüber einem analog der Herstellung künstlicher Aggressine gewonnenem Extrakt aus zerriebenen, frischen Impfpusteln. Als hämolytisches System kamen Hühnerblutkörperchen und Hühnerblut-Kaninchenserum zur Anwendung. Die Resultate

der Versuchsreihen beweisen nach Jobling die Gegenwart spezifischer Immunkörper, jedoch nur in unbedeutender Menge. Bei der Bedeutung, der nach den Ansichten aller Autoren, welche eingehend experimentell die Komplementbindung durch spezifische Stoffe geprüft haben, den Fehlerquellen, den nichtspezifischen Komplementverankerungen und den daraus resultierenden Hemmungen durch die einzelnen Substanzen, durch Präzipitationsprozesse und durch Adsorption etc. zukommt, die für die positive Auslegung notwendigen Kontrollserien vermißt man zwischen Immunsorum, sowie Normalserum einerseits und einem — sit venia verbo — künstlichen Aggressin aus nicht spezifischen Pusteln oder normaler Rinder-, resp. Kälbepidermis andererseits. Jedoch lehren die im hiesigen Institute angestellten Versuchsreihen, daß die Bindungsprozesse zwischen Immunsorum und Vaccineaggressin keine graduellen, den zugesetzten Mengen entsprechenden Abstufungen in der Hemmung ergeben, sodaß mangels positiver Ergebnisse in dieser Richtung auf Kontrollen mit Normalaggressin verzichtet werden konnte. Im übrigen wurden die Versuche folgendermaßen angestellt.

Einem jungen Rind wurde Blut entzogen, um daraus normales Rinderserum zu gewinnen. Alsdann wurde das Tier geimpft und nach Abheilung der Impfflächen mehrfach mit glyzerinierter, später mit frischer, feingeriebener Lymphe intravenös injiziert. Während dieser forcierten Immunisation wurden mehrmals Blutentnahmen zur Serumherstellung vorgenommen. Die sämtlichen Serumproben wurden in wiederholten Reihen nach Analogie der Versuche mit Lyssamaterial auf mehrere verschiedenartig präparierte Lymphsubstanzen untersucht. Doch wurden diese zunächst allein, ebenso wie die Sera, auf ihre hemmenden Wirkungen in abgestuften Mengen geprüft. Die Vaccineflüssigkeiten waren auf folgende Weise präpariert:

Frische Lymphe wird drei Viertelstunden lang mit der Hand im Mörser zerkleinert, sechsmal unter Zusatz von Kochsalzlösung durch die Chalybaeus-Mühle getrieben und dann im Eisschrank zwecks Absitzen stehen gelassen. Die überstehende Flüssigkeit wird in zwei Partien während 24 Stunden geschüttelt und zentrifugiert, ein Teil schwach, der andere besonders intensiv. Trotzdem ist eine völlige Klärung nicht zu erreichen. In gleicher Weise wird ein Aggressin gewonnen mit einer Lymphe, die während einiger Wochen in Kochsalzlösung im Eisschrank mazeriert war. Schließlich wurde der analoge Prozeß mit glyzerinierter Lymphe vorgenommen.

Von diesen sämtlichen Substanzen wirkte stark zentrifugiertes Aggressin von frischer Lymphe bei Zusatz von 0,1 ccm nur noch wenig hemmend, noch etwas geringer beeinflusste Aggressin glyzerinierter Lymphe die Hämolyse. Auch Glycerin allein in der gleichen Konzentration störte in wechselnden Dosen die Hämolyse nicht. Infolgedessen wurden beide Aggressine in einer Menge von 0,1 ccm für die Serien verwendet, doch zeigten sich weder bei Zusatz von Normalserum noch von den fünf Immunsorumproben (0,5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,03, 0,01 ccm) logische Unterschiede oder abgestufte Reihen.

Auch bei Wiederholungen und Modifikationen wurden keine anderen Resultate erhalten, sodaß aus den sämtlichen Serien der Schluß gezogen werden muß, daß trotz sorgfältigster Prüfung und mannigfacher Versuchsanordnung mit der Methode der Komplementverankerung im Immunsorum mit Vaccine geimpfter und intravenös immunisierter Rinder gegenüber künstlichen Lymphaggressinen spezifische Stoffe nicht nachgewiesen werden konnten.

Literatur: Wassermann, Neisser und Bruck, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 16. — A. Neisser, C. Bruck, A. Schucht, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 48. — Wassermann und Bruck, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 12. — Möreschi, M. Neisser und Sachs, Medizinische Klinik 1905, No. 55. Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 12. — M. Neisser und Sachs, Berliner klinische Wochenschrift 1905, No. 44. Ibid. 1906, No. 3. Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 39. — Bordet und Gengou, Annales de l'Institut Pasteur Bd. 15, 1901. — Gay, Berliner klinische Wochenschrift 1906. Zentralblatt für Bakteriologie 1905, S. 603. Annales de l'Institut Pasteur 1905. — Gengou, Annales de l'Institut Pasteur Bd. 16, 1902. — Kolle und Wassermann, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 16. — Möreschi, Berliner klinische Wochenschrift 1906, No. 38, 1906, No. 7. — Wassermann und Plaut, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 44. — Uhlenhuth, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 31. — Vannod, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 49. — Detre, Wiener klinische Wochenschrift 1906, No. 21. — Leuchs, Berliner klinische Wochenschrift 1907, No. 3 und 4. — Heller und Bertarelli, Zentralblatt für Bakteriologie Abt. I, Bd. 36, 1903. — A. Marie, Annales de l'Institut Pasteur 1905, Janvier No. 1. — O. Heller, Schutzimpfung gegen Lyssa. Jena, Gustav Fischer, 1906. — Wassermann, Neisser, Bruck und Schucht, Zeitschrift für Hygiene 1906, Bd. 55, S. 451. — Jobling, Journal of exp. Med. Bd. 8, No. 6. — E. Friedberger, Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 15. — Muir und Martin, Journal of Hygiene Bd. 6, No. 3, Juli 1906. — Pfeiffer und Möreschi, Berliner klinische Wochenschrift 1906, S. 33. — Liefmann, Berliner klinische Wochenschrift 1906. — Baliner und Reibmayr, Münchener medizinische Wochenschrift 1907, No. 13. — Ranzi, Wiener klinische Wochenschrift 1906, No. 51.