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

Weitere Erfahrungen über Verwendung von Azetonextrakten bei der Serumdiagnostik der Syphilis.

Von Dr. Otto Stiner.

In einer früheren Publikation¹⁾ war von Herrn Prof. Kolle und mir über die Verwendung von Azetonextrakten ausluetischer Fötalleber zur Serumdiagnostik der Syphilis berichtet worden. Es wurde darauf hingewiesen, daß die Wa.R. bei Verwendung von Azetonextrakten empfindlicher und zugleich zuverlässiger wird, da die Azetonextrakte weniger Eigenhemmung zeigen und doch bei positiv reagierenden Sera stärkere Ausschläge geben als brauchbare Alkoholantigene, und weil ferner die Gefahr der Fehldiagnosen durch Erweiterung der Reaktionszone stark herabgesetzt wird. Es mußten also die Azetonextrakte den alkoholischen, die bisher das gebräuchlichste Antigen darstellen, als überlegen bezeichnet werden. Die Richtigkeit der damals aufgestellten Behauptungen wurde nun von mir an einem größeren Material nachgeprüft. Zugleich suchte ich durch chemische Untersuchungen die Gründe der Ueberlegenheit der Azetonextrakte zu erfahren.

Das Azeton ist schon deshalb als Lipoidlösungsmittel interessant, weil es im menschlichen Organismus regelmäßig vorkommt und in Spuren in jedem normalen Urin ausgeschieden wird. Es entsteht in größerer Menge immer dann, wenn durch Entziehung der Kohlehydrate der Körper darauf angewiesen ist, seinen Energiebedarf ausschließlich durch Verbrennung von Eiweiß und Fett zu decken.²⁾ Der Azetongehalt des Urins ist vermehrt im Fieber, im Hunger, bei reiner Fleischkost, bei

¹⁾ Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß bei größerer, diesen bisher unbeachtet gebliebenen Verhältnissen gewidmeter Aufmerksamkeit noch feinere für die Enuresisbehandlung brauchbare Details gewonnen werden. So steht z. B. der Mais im Rufe, diuretisch zu wirken. Hafer soll dagegen die Harnmengen verringern (Weiske). Birne und Apfel verhalten sich ähnlich.

²⁾ Diese Wochenschrift 1911, Nr. 38.

³⁾ Sahli, Handbuch der Untersuchungsmethoden.

gewissen Formen von Verdauungsstörungen, bei manchen Karzinomen und vor allem in manchen Fällen von Diabetes mellitus. Nach Embden wird das Azeton in der Leber gebildet, also in dem Organ, an dem es, wenn die Schädigung durch die Spirochäten vorausgegangen ist, seine Lösungskraft am stärksten zur Geltung bringt.

Auf Grund der Versuche von Erlandsen¹⁾ konnte man erwarten, daß die in den Azetonextrakten enthaltenen Lipide sich in Qualität und Quantität von den durch Alkohol gelösten unterscheiden würden. Die folgenden Versuche bestätigen diese Annahme:

Gleich große Mengen (2 g) getrockneter Leber wurden mit je 100 ccm Azeton und Alkohol extrahiert. Die so erhaltenen Antigene wurden auf ihre Wirksamkeit geprüft und dann im Vakuum eingetrocknet. Die Rückstände wurden von Herrn Dr. Abelin im Chemisch-medizinischen Institut unserer Universität (Direktor: Prof. Emil Bürgi), der mich in dankenswerter Weise bei meinen Untersuchungen unterstützte, gewogen und auf ihre Zusammensetzung untersucht. Die Resultate der vergleichenden Untersuchungen sind recht interessant.

Es wurden je 100 ccm Azeton- und Alkoholextrakte unter den üblichen Kautelen im Vakuum verdampft und der Trockenrückstand gewogen. Die Unterschiede zwischen Azeton und Alkohol erwiesen sich als sehr groß. Hat schon Erlandsen gezeigt, daß von dem Azeton bedeutend weniger Fett gelöst wird als von Alkohol, so ist der Unterschied der aus derluetischen Leber extrahierten Fette und Lipide bedeutend größer.

Bei den für die Wa.R. brauchbaren Extrakten A (alkoholischer Extrakt) und Aa (Azetonextrakt) aus derselben Leber wog der Trockenrückstand des Alkoholextraktes aus 100 g (2 g pulverisierte Leber auf 100 ccm Alkohol) = 0,6980 g. Der Rückstand aus dem in gleicher Weise hergestellten Azetonextrakte dagegen wog 0,0714 g, also rund zehnmal weniger. Dabei war der Azetonextrakt bedeutend wirksamer als der alkoholische und zeigte besonders bei latenter und behandelter Lues positive Reaktion da, wo die Alkoholextrakte im Stiche ließen.

Bei den Extrakten aus einer zweiten Leber, die für die Wa.R. untauglich waren, gestalteten sich die Lösungsverhältnisse anders. Der Rückstand der Azetonextrakte betrug 0,276 g, der des Alkoholextraktes 0,464 g, also annähernd das Doppelte.

Eine dritte Leber von mittlerer Brauchbarkeit zeigte wieder etwas größere Unterschiede: 0,1370 g Rückstand des Azeton-, 0,3130 g des Alkoholextraktes. Bei dieser Leber waren Azeton- und Alkoholextrakte von ungefähr gleicher Wirksamkeit.

Gestützt auf diese vergleichenden Untersuchungen, gelangt man zu der Annahme, daß das Azeton entweder ein besseres Lösungsvermögen für die bei der Wa.R. zur Wirkung gelangenden Lipide besitzt, oder aber, daß es als elektives Lösungsmittel eine Anzahl von Neutralfetten und eventuell auch von Lipiden nicht löst, die in den Alkoholextrakten die Wirkung herabsetzen bzw. für die Wirksamkeit irrelevant sind. In allen untersuchten Extrakten wurden Lezithin und Cholesterin von Dr. Abelin nachgewiesen.

Bei einem Extrakt wurde mittels der Digitoninmethode nach Windaus die Menge des Cholesterins festgestellt. Sie betrug 0,0145 g in Azetonextrakt bei 0,276 g Rückstand und 0,0185 g im Rückstand des Alkoholextraktes (0,464).

Die vergleichenden Untersuchungen der Extrakt rückstände lassen vermuten, daß Lezithin und Cholesterin in den zur Serumdiagnostik der Syphilis verwendeten Antigenen eine wesentliche Rolle spielen, daß aber noch eine Reihe anderer Stoffe sich am Zustandekommen der positiven Wa.R. beteiligen. Zur Feststellung dieser Stoffe wurden weitere Versuche angestellt, die leider nicht zum Ziel führten, aber doch vielleicht einige Anhaltspunkte geben. Es wurden Kolben mit Alkohol- und Azetonextrakten verschiedener Herkunft in Gefriermischungen gebracht in der Absicht, die gelösten Lipide durch Ausfällen zu separieren. Es gelang dies auch bei den meisten Extrakten. Während bei den Alkoholextrakten aus normalen Organen und aus Luesleber, sowie bei den Azetonextrakten aus normalen Organen charakteristische Fett-nadeln ausfielen, zeigte der Niederschlag aus den Azetonextrakten aus Luesleber keine regelmäßige Struktur, sondern bestand aus regellosen Klümpchen. Die durch diesen Ausfällungsprozeß „gereinigten“ Alkoholextrakte blieben brauchbar und wurden zum Teil wirksamer. Die Azetonextrakte waren nicht mehr verwendbar. Die ausgefallenen Substanzen konnten wegen ihrer geringen Mengen nicht untersucht werden.

Bei Destillation der Extrakte konnte der mit dem vorher verwendeten Lösungsmittel wieder aufgenommene Rückstand als Antigen benutzt werden. Das Destillat war wirkungslos. Wurde das Lösungsmittel gewechselt, z. B. der Rückstand eines Azetonextraktes mit Alkohol aufgenommen, so waren die damit erzielten Reaktionen zum Teil nicht spezifisch.

¹⁾ Ivar Bang, Chemie der Lipide.

Wie aus diesen Untersuchungen hervorgeht, müssen in den wirklich guten Azetonextrakten unspezifische Stoffe fehlen, die in dem Alkoholextrakt vorhanden sind und offenbar mit den bei der Serumiagnostik der Lues wirksamen Lipoiden gar nichts zu tun haben. Denn sonst wäre es nicht erklärlich, warum ein Azetonextrakt (Aa), der zehnmal weniger gelöste Stoffe enthält als ein aus derselben Leber hergestellter Alkoholextrakt (A), sich besser für die Wa.R. eignen sollte als der ebenso hergestellte Alkoholextrakt.

Aus diesen Resultaten kann man jedenfalls schließen, daß die Behauptung von Kolle und Stiner, es enthalte der Azetonextrakt hauptsächlich die für die Wa.R. charakteristischen Lipide, durchaus zutrifft.

Fritz Munk¹⁾ ist in einer Publikation „Ueber Antigene zur Wa.R.“ dieser Anschauung entgegengetreten. Die Folgerungen, die er aus seinen Untersuchungen und kritischen Betrachtungen der bisherigen Theorien knüpft, sind aber wenig einleuchtend. Nach Munk würde die Wirksamkeit der für die Serumiagnostik der Syphilis verwendeten Antigene von der Oberflächenspannung abhängen. Er stützt sich dabei in erster Linie auf die Versuche von Sachs und Rondoni, wonach die Antigene dadurch wirksamer werden, daß die zur Verdünnung benutzte Kochsalzlösung tropfenweise zugesetzt wird. Abgesehen davon, daß dieses Verfahren bei groß angelegten Versuchen, wo 100 ccm und mehr Verdünnung benötigt werden, ziemlich langwierig wäre, haben wir nie beobachten können, daß die Art und Weise des Vorgehens bei der Verdünnung für die Azetonextrakte eine Rolle spielte. Uebrigens machen unsere vergleichenden Untersuchungen eine Wirkung der Oberflächenspannung und damit die Erklärung der Wa.R. als eines physikalischen Vorganges unwahrscheinlich.

Die beiden oben erwähnten Extrakte A und Aa zeigten sich beide für die Wa.R. brauchbar. Nun reagierte der Azetonextrakt Aa z. B. in einem Falle noch in einer Verdünnung von 0,002 ccm, während beim Alkoholextrakt die Grenze der Wirksamkeit bei einer Verdünnung von 0,05 lag. Nach den weiter oben angegebenen Resultaten der Wägung enthielten 100 ccm Azetonextrakt Aa 0,07 Trockenrückstand; 0,002 ccm, die noch imstande gewesen waren, eine komplette Hemmung der Hämolyse mit Syphilitikerserum zu bewirken, enthielten also an Substanz 0,0000014, während die zehnfache Dosis Alkoholextrakt, die immer noch 0,00014 g, also das Hundertfache an Substanz gelöst enthielt, absolut keine Hemmung der Hämolyse hatte hervorbringen können.

Abgesehen davon, daß die Menge von 0,0000014 g wohl keine Aenderung der Oberflächenspannung bewirkt, die ein so eklatantes Ereignis wie die komplette Hemmung der Hämolyse hervorrufen kann, sollte doch wohl für die physikalischen Vorgänge der 100 mal gehaltreichere Alkoholextrakt stärker wirken. Es scheint mir also trotz der Munkschen Ausführungen immer noch vorsichtiger, an der Theorie einer chemischen Wirkung bestimmter Lipide beim Zustandekommen der Wa.R. festzuhalten, als an deren Stelle rein physikalische Vorgänge anzunehmen. Die „charakteristischen Lipide“ leuchten mir mehr ein als eine eventuelle „charakteristische Oberflächenspannung“.

Die Behauptung Munks, daß alle alkoholischen Extrakte aus luetischer Leber, aus Meerschweinchenherz, aus Kartoffeln etc. annähernd dieselben Resultate bei der Serumiagnostik der Lues geben, ist theoretisch kaum genügend begründet, erweist sich aber in der Praxis als durchaus unzutreffend. Die Extrakte aus luetischer Leber sind allen anderen, besonders aber den künstlichen Antigengemischen, bedeutend überlegen, und durch die 20–30 % von positiven Reaktionen, die uns die Verwendung von Luesleberextrakt mehr liefert als die Benutzung anderweitigen Materials, können jährlich Tausende von luetischen Erkrankungen einer rationellen Behandlung zugeführt werden. Noch größere Zahlen werden erreicht bei Verwendung von Azetonextrakten in der Hand eines Geübten.

Bei der Extraktion der luetischen Leber mit Azeton zeigt sich am besten ihre Ueberlegenheit über die anderen als Ausgangsmaterialien für Antigenbereitung benutzten Stoffe. Vergleichende Untersuchungen mit einer großen Anzahl von luetischen und normalen Organen haben ergeben, daß das Azeton im Gegensatz zum Alkohol aus normalen Organen fast gar keine brauchbaren Stoffe extrahiert. Azetonextrakte aus Meerschweinchenherzen, Ochsenherzen und anderen tierischen Organen waren noch weniger wirksam als die im Verhältnis zu Luesleberextrakten schon bedeutend weniger brauchbaren entsprechenden Alkoholextrakte. Extrakte aus Pflanzen und Pflanzenteilen ergaben wohl, wie Munk behauptet, in genügender Konzentration Hemmung der Hämolyse, aber ganz regellos. Man muß sich

darüber klar sein, daß Hemmung der Hämolyse und positive Wa.R. zwei verschiedenartige Begriffe sind.

Aehnliche Resultate wie mit Azeton erhielt ich bei Herstellung von Extrakten mittels Methyl- und namentlich mit Propyl- und Isopropylalkohol. Aber auch diesen Körpern zeigte sich das Azeton als Lipoidlösungsmittel überlegen, wenn auch nicht in dem Maße wie dem Aethylalkohol.

Leider zeigte sich bei Untersuchung eines größeren Materials von Lebern syphilitischer Föten der Uebelstand, daß nur ein relativ kleiner Prozentsatz der Lebern zur Herstellung von Azetonextrakten wirklich benutzbar war. Ich erhielt oft bei der Ausprüfung von zehn Lebern, von denen doch drei bis vier leidlich brauchbare Alkoholantigene lieferten, kaum einen stark wirksamen Azetonextrakt. Das läßt sich wohl darauf zurückführen, daß das Azeton eben nur die für die Lues charakteristischen Lipide extrahiert. Hat man dann aber nach Untersuchung einer größeren Anzahl von Lebern einen guten Azetonextrakt erhalten, so ist dieser, wie schon früher bemerkt wurde, außerordentlich viel feiner und wirksamer und übertrifft bezüglich Sicherheit und Zuverlässigkeit die Alkoholantigene weit. Daß manche Untersucher bisher keine guten Resultate mit Azetonextrakten erhalten haben, liegt wohl daran, daß sie nicht eine genügend große Anzahl von Lebern untersucht haben und deshalb noch nicht in den Besitz tadelloser Azetonextrakte gelangt sind. Wegen der hohen Wirksamkeit dieser Antigene lohnt es sich aber, danach zu suchen, um so mehr, als eine zu deren Herstellung wirklich brauchbare Leber eine sehr große Menge Extrakt liefert.

Gute Azetonextrakte müssen immer stark verdünnt werden, gewöhnlich 1 : 70 bei 1 : 80. Rechnen wir auf eine mittelgroße Leber etwa 12–15 g trockener pulverisierter Substanz, so erhalten wir daraus 12–15 mal 70, also etwa einen Liter Extrakt oder 10 000 Gebrauchsdosen zu 0,1 ccm.

Zur Untersuchung von Zerebrospinalflüssigkeit auf Syphilis erwiesen sich die Azetonextrakte zu unserem großen Erstaunen als unbrauchbar. Ich wurde von Herrn Hofrat Th. Koch in Stuttgart darauf aufmerksam gemacht, daß das Azeton in der Lumbalflüssigkeit wahrscheinlich eine Globulinfällung hervorruft und die Luesreaktion deshalb unspezifisch sei. Systematische Untersuchungen führten mich denn wirklich zu dem Ergebnis, daß die mit Azetonextrakten erzielten Resultate der Luesdiagnostik aus Lumbalflüssigkeit unzuverlässig waren. Die Verwendung von Azetonextrakten kann also bloß bei der Untersuchung von Blutserum in Betracht kommen.

Für die Ueberlegenheit der Azetonextrakte gemäß den von Kolle und Stiner aufgestellten Behauptungen sprechen vergleichende Untersuchungen, die ich an 500 Sera vornahm. In einem großen Prozentsatz von Syphilisfällen haben wiederum die Azetonextrakte Hemmung der Hämolyse bewirkt, wo die alkoholischen Antigene im Stiche ließen, bei latenter Lues, bei weit zurückliegender Infektion und besonders bei nervösen Störungen auf luetischer Basis. Bei behandelten Fällen zeigten die Azetonextrakte oft noch durch positive Reaktion Ueberbleibsel der syphilitischen Noxe an, wenn bei Verwendung von Alkoholextrakten Hämolyse eintrat und so die Heilung vorgetäuscht wurde. Bei Salvarsanbehandlung erhält man in vielen Fällen schon nach der ersten oder zweiten Injektion negative Reaktion bei Benutzung von alkoholischen Extrakten, während die Azetonextrakte fast stets erst dann die Hämolyse nicht mehr hemmen, wenn energische Quecksilberkuren die Arsenbehandlung unterstützt haben. Es entsprachen die mit Azetonextrakten erzielten Resultate den klinischen Erfahrungen.

Syphilitische Erkrankungen des Nervensystems wurden von den Azetonextrakten sehr prompt angezeigt. Eine ganze Reihe von Fällen mit Symptomen von beginnender Tabes und Paralyse reagierten mit Azetonantigenen positiv, während sie mit Alkoholextrakten noch negativ anzeigten; später erst, wenn die nervösen Störungen stärker geworden waren, reagierten dann auch die Alkoholextrakte und bestätigten damit die Resultate der früher und feiner wirkenden Azetonextrakte. Bei Verdacht auf Hirntumor, bei hartnäckigen Neuralgien leisteten die Azetonextrakte sehr oft gute Dienste, indem sie der Therapie

¹⁾ Ueber Antigene zur Wa.R., diese Wochenschrift 1912, Nr. 19.

den Weg zeigten. Ein sehr frappantes Beispiel feiner Wirkung der Azetonextrakte liefern zwei Fälle, die miteinander zur Untersuchung kamen.

Fall 1. Kind A erkrankt mit Symptomen von Hirndruck. Beide Eltern sind nachgewiesen syphilitisch. Diagnose: Hirntumor auf luetischer Basis. Serumdiagnostik: Alkoholantigen negativ, Azetonantigen negativ.

Fall 2. Kind B mit Symptomen von Hirntumor. Diagnose, hauptsächlich auf die Anamnese gestützt: Solitärtuberkel. Serumdiagnostik: Mit Alkoholantigenen negativ, mit Azetonantigenen stark positiv. Der Ausfall der beiden Untersuchungen setzte uns fast dem Verdachte aus, wir hätten die beiden Blutproben verwechselt. Der Verlauf der Krankheit gab uns aber recht. Kind A kam nach einigen Wochen zur Sektion mit einer ausgedehnten Tuberkulose des Großhirns. Die Symptome bei Kind B gehen auf eine spezifische Kur langsam aber stetig zurück.

Im ganzen reagierten auf 500 Untersuchungen 208 Sera mit Alkoholextrakt positiv, also etwa 40 %, mit Azetonextrakt 261 oder etwa 52 %, die sichere Syphilitiker betrafen. Die Azetonextrakte haben also in 53 Fällen sicherer Lues positiv angezeigt, wo die Alkoholantigene versagt haben, also in einer Anzahl von Fällen, die etwa 25 % der gesamten mit Alkoholextrakt erzielten Reaktionen entspricht.

Zusammenfassung. Die von Kolle und Stiner behauptete Ueberlegenheit der Azetonextrakte aus Luesleber über die anderen bei der Serumdiagnostik der Syphilis gebräuchlichen Antigene ist durch Untersuchungen an einem größeren Material bestätigt. Stark wirksame, gut eingestellte Azetonextrakte erzeugen in einem großen Prozentsatz von sicheren Syphilisfällen eine positive Reaktion, wo die anderen gebräuchlichen Antigene versagen.

Die praktische Verwendung von Azetonextrakten erfährt dadurch eine gewisse Einschränkung, daß nur höchstens 10 % der verarbeiteten Lebern luetischer Föten die hochwirksamen, praktisch brauchbaren Extrakte liefern.

Zur Diagnostik der Lues aus Lumbalflüssigkeit sind die Azetonextrakte unbrauchbar.

Durch vergleichende Bestimmungen der Rückstände aus Alkohol- und Azetonextrakten ist der Nachweis erbracht, daß Azetonextrakte bei gleicher oder höherer Wirksamkeit bedeutend weniger gelöste Stoffe enthalten als die Alkoholextrakte. Es besteht deshalb wohl die Annahme zu Recht, daß das Azeton aus der luetischen Leber hauptsächlich die für Syphilis charakteristischen Lipide löst.

Es liegen keine stichhaltigen Gründe vor, die Wa.R. als einen physikalischen Vorgang aufzufassen.