Aus dem Staatlichen Hygienischen Institut in Bremen. (Mit der Oberleitung beauftragt Prof. Dr. Tjaden. Medizinische Abteilung, Abteilungsvorsteher Dr. Meyer.)

Eine neue serologische Methode zur Syphilisdiagnose.

Von Dr. G. Seiffert.

Eine größere Zahl von Publikationen aus der letzten Zeit zeugt davon, daß die Bestrebungen, mittels physikalisch-chemischer Methoden Immunitätsvorgänge in vitro nachzuweisen, auch gewisse praktische Erfolge gewonnen haben. Die Oberflächenreaktionen zwischen Antigen und Antikörper wurden besonders von Weichardt, Ascoli und ihren Mitarbeitern studiert. Weichardt war der erste, der schon 1908 auf die Möglichkeit, die Methoden zur Bestimmung von Oberflächenreaktionen in der Serologie zu verwenden, hinwies. Er studierte die Vorgänge mit dem von ihm angegebenen Diffusiometer. Die Ergebnisse seiner Versuche wurden sowohl von R. Kraus und Amiradzibi wie durch Ascoli und seine Mitarbeiter bestätigt. Letzterer verwandte nur eine andere Methodik, während das Prinzip beider Versuchsanordnungen gleich war. Ascoli benutzte das Traubesche Stalagmometer und maß dabei die Zahl der in einer Zeiteinheit fallenden Tropfen, während Weichardt den in einer Zeiteinheit erfolgenden Umschlag eines Indikators als Maß nahm.

In letzter Zeit veröffentlichten Weichardt und sein Mitarbeiter Schroen zwei Arbeiten, worin Weichardt eine modifizierte und verbesserte Methodik angab und auf die mannigfache praktische Verwendung der Oberflächenreaktionen hinwies. Er bezeichnete diese Reaktion allgemein als Epiphaninreaktion. (επιφανεία = die Oberfläche.)

Durch einige Versuche, die an anderer Stelle ausführlich mitgeteilt werden sollen, konnten die Beobachtungen Weichardts und Schroens bestätigt werden. Spezieller wurde zunächst die Verwendbarkeit der Reaktion zur serologischen Syphilisdiagnose an Hand von 75 Sera, die dem Institut zu Anstellung der Wassermannschen Reaktion zugewiesen waren, studiert.

Unter wesentlicher Aenderung der von Weichardt angegebenen Methodik wurde die Reaktion auf folgende Weise angestellt.

Gegen Zehntelnormalschwefelsäure wird eine Barytlösung genau eingestellt, sodaß durch Zusatz eines Kubikzentimeters Barytlösung der Neutralpunkt erreicht wird. Als Indikator dient alkoholische Phenolphthaleinlösung. In sorgfältigst gereinigte und mit destilliertem Wasser ausgespülte schmale Reagenzgläser wird 0,1 ccm des auf 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Serums, das untersucht werden soll, eingefüllt. Das Serum ist möglichst frisch nach der Entnahme zu verwenden. Zu dem Serum wird 0,1 ccm der Verdünnung eines alkoholischen Extraktes aus einer syphilitischen Fötalleber gegeben; die Verdünnung muß bei jedem Versuch frisch in dem Verhältnisse 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt werden. Dann wird, ohne zu schütteln, langsam 1 ccm n./10 Schwefelsäurelösung zugegeben. Hierzu kommt, äußerst genau abgemessen, ccm der gegen n./10 Schwefelsäurelösung ein-

gestellten Baryumhydroxydlösung. Als Indikator wird ein Tropfen alkoholischer Phenolphthaleinlösung zugefügt und dann sorgfältigst umgeschüttelt (am besten nach Aufsetzen eines mit destilliertem Wasser abgewaschenen Gummistopfens). Bei genauer Einstellung der Lösung ist sofort der Gegensatz zwischen einem gesunden und einem syphilitischen Serum am Farbenunterschied zu bemerken. Bei dem Serum eines Nichtsyphilitikers ist eine Verschiebung des Neutralpunktes im Sinne verminderter H-Ionenkonzentration vorhanden, das heißt, die Lösung ist nicht gefärbt, während bei einem syphilitischen Serum eine Verschiebung des Neutralpunktes im Sinne vermehrter OH-Ionenkonzentration stattfindet. Bei positivem Ausfall der Reaktion findet daher ein Farbumschlag des Phenolphthaleins nach Rot statt.

Mit Sera, die $\frac{1}{2}$ Stunde bei 56° inaktiviert wurden, ließen sich schärfere Resultate erhalten als mit nicht inaktivierten Sera. Länger aufbewahrte Sera erwiesen sich als nicht mehr brauchbar.

Sicher läßt sich die Reaktion nur mit peinlichst gereinigten Pipetten und Reagenzgläsern machen. Die Lösungen müssen sehr genau gegeneinander eingestellt sein und sind vor dem Gebrauch daraufhin jedesmal zu prüfen. Ist die Baryumhydroxydlösung durch die Kohlensäure der Luft getrübt worden, so darf sie nicht mehr verwandt werden. Sie darf daher niemals offen an der Luft stehen, und ebensowenig darf der Inhalt der Pipetten wieder in die Flasche zurückgeblasen werden. Bei den Versuchen genügten genaue, bis auf 0,01 cem geeichte, 1 cem fassende Ausflußpipetten. Für Schwefelsäure und Baryumlösung wurden bei allen Versuchsreihen nur zwei Pipetten benutzt, um keine Versuchsfehler durch Benutzung verschiedener Pipetten zu erhalten. Ausblaspipetten sind unbrauchbar, 10 cem Pipetten sind trotz Eichung nicht zuverlässig, da mit ihnen ein genügend genaues Abmessen nicht möglich ist. Nach Füllung der Pipette ist jede Flüssigkeit an der Ausflußöffnung mit Fließpapier abzuwischen. Nur bei sorgfältigstem Abmessen der zuzusetzenden Flüssigkeiten ist ein sicherer Ausfall der Reaktion möglich. Letztere muß bei jedem Serum dreimal wiederholt werden. Bei den später angeführten Versuchen sind nur Resultate mitgeteilt, die ein gleiches Ergebnis bei dreimaligem Versuch hatten.

Zur Kontrolle sind vor Anstellung des Versuches der Extrakt (1 cem der Verdünnung 1 : 10), die Kochsalzlösung allein und das Serum (0,1 cem der Verdünnung 1 : 10) ohne Extraktzusatz zu prüfen. Dabei darf eine Verschiebung des Neutralpunktes im Sinne vermehrter OH-Ionenkonzentration, sodaß die Lösung rot wird, nicht stattfinden. In einem derartigen Falle sind neue Lösungen zu nehmen, das Serum muß soweit verdünnt werden, bis der Neutralpunkt der Lösung erreicht ist.

Soll die Verschiebung des Neutralpunktes exakt gemessen werden, so muß die Barytlösung so gegen 1 cem n/10 Schwefelsäure eingestellt werden, daß erst 1 cem Barytlösung und eine bestimmte Menge dieser auf das Zehnfache verdünnten Lösung (z. B. 0,50 cem) nötig sind, um eine Rosafärbung der Lösung zu erhalten. Vor Anstellung des Versuches wird eine Kontrolle aus Schwefelsäure, Barytlösung und Phenolphthalein von schwacher Rosafarbe hergestellt, die zum kolorimetrischen Vergleich dienen soll. Sie muß im fest verschlossenen Reagenzglas aufbewahrt werden, um Kohlensäure fern zu halten, und muß bei Verwendung stets vorher umgeschüttelt werden. So ist es möglich, den Farbumschlag als ein Meßmittel für die Stärke der Antigen-Antikörperreaktionen zu benutzen. Es werden z. B. bei dem Serum eines Gesunden 0,65 cem der n/10 Baryumhydroxydlösung verbraucht, um die Farbe der Kontrolle zu erhalten, während bei dem Serum eines Syphilitikers 0,25 cem verbraucht werden. In diesen beiden Fällen ist der Titer des syphilitischen Serums als $-\frac{0,25}{0,65}$, der des gesunden Serums als $+\frac{0,15}{0,65}$ zu bezeichnen, da die stärkere Barytlösung mit der zugefügten um das Zehnfache schwächeren Barytlösung so eingestellt ist, daß zu einem Kubikzentimeter der ersteren noch 0,50 cem der dünneren Lösung zugefügt werden muß, um den Neutralpunkt bei Zusatz von 1 cem 1/10 Normalschwefelsäure zu erhalten. Die Barytlösung muß je nachdem, ob mehr oder weniger als 0,50 cem verbraucht wurde, nach der positiven oder negativen Seite gerechnet werden. Für Fälle, bei denen durch einen geringeren Zusatz von Barytlösung als 0,05 cem schon ein Farbumschlag erreicht wird, kann eine sichere Diagnose nach der einen oder anderen Richtung nicht abgegeben werden.

Zu welchen Resultaten führten die Untersuchungen? Zunächst wurden acht Sera, bei denen der Wassermann positiv war, und zwei, bei denen die Wassermannsche Reaktion negativ war und wo auch die Krankengeschichte keinen Anhaltspunkt für eine syphilitische Infektion bot, geprüft, ob für die Anstellung der Reaktion ähnlich wie bei der Wassermannschen Reaktion Extrakt ausluetischer Leber und Extrakt aus Meer-schweinchenherzen brauchbar wäre. Es ergab sich bei allen Sera eine völlige Uebereinstimmung in dem Sinne, daß eine Reaktion mit alkoholischem Extrakt aus Meer-schweinchenherzen nicht eintrat, während stets sich eine Verschiebung des Neutralpunktes bei Verwendung von alkoholischem Ex-

trakt aus einer syphilitischen Fötalleber und syphilitischem Serum nachweisen ließ.

Auf Grund dieser Ergebnisse läßt sich sagen, daß zur Auslösung dieser Reaktion, bei der es noch unentschieden ist, ob sie mit einer anderen, in vitro nachweisbaren Immunitätsreaktion (Präzipitation?) identisch ist, eine spezifische, in derluetischen Leber enthaltene Komponente nötig ist, welche dem Extrakt aus Meer-schweinchenherzen fehlt.

Diese Versuche können vielleicht als Beweis für die stets von Wassermann und seinen Mitarbeitern verfochtene Ansicht dienen, daß bei Syphilis spezifische Immunitätsvorgänge stattfinden, neben denen noch andere für Syphilis charakteristische Stoffwechseländerungen auftreten, die auch die Verwendung künstlicher Extrakte bei der Wassermannschen Reaktion ermöglichen.

Der Vergleich des Ausfalls beider Reaktionen an Hand einer Untersuchung von 75 Sera führte zu folgenden Resultaten. Unter den Sera reagierten nach beiden Methoden positiv 43 Sera, negativ 21 Sera. Bei elf Sera war eine Uebereinstimmung beider Reaktionen nicht vorhanden. Niemals trat der Fall ein, daß die Wassermannsche Reaktion positiv und die Epiphaninreaktion negativ war, mit anderen Worten, daß bei positiv sicherer Syphilis die Reaktion versagte. Von elf Sera mit negativem Wassermann reagierten mit der Epiphaninreaktion deutlich positiv neun Sera, bei zwei Sera ließ sich ein sicheres Resultat nicht abgeben.

Zu den Sera, welche nach Wassermann ein negatives, mit der Epiphaninreaktion aber ein positives Resultat gaben, gehören folgende Krankengeschichten:

1. No. 4813. Vor $1\frac{1}{2}$ Jahren Infektion, zurzeit leichter Verlauf, drei Hg-Kuren. Jetzt immer Kopfschmerzen und Benommenheit. Soll mit Ehrlich-Hata behandelt werden.
2. No. 4968. Im Juni halbe Schmierkur. Dann unbehandelt. Jetzt Rezidiv (Ulceram am Präputium).
3. No. 4959. Am 6. September Einspritzung von 0,7 Ehrlich-Hata. Nachprüfung des damals positiven Wassermann am 22. September.
4. No. 4874. Vor sechs Jahrenluetisch infiziert, schwere und hartnäckige Rezidive besonders im Hals. Sechs Hg-Kuren. Jetzt kleine papulöse Stelle im Gesicht. (Akne oder Lues?)
5. No. 5023. Vor 14 Tagen Infektion.
6. No. 5157. Ist am 20. August mit Ehrlich-Hata 0,5 behandelt worden. Anscheinend Rezidiv an den Fingern (schuppige Papeln).
7. No. 4832. Ulceram am ganzen Körper. Wassermann 14 Tage vorher positiv.
8. No. 4884. Beide Elternluetisch. Als kleines Kind wurde Patient nicht behandelt. Seit drei Jahren erkrankte er an gummöser Entzündung der Kniegelenke, die trotz vieler Hg-Kuren noch nicht ausgeheilt ist. Soll mit Ehrlich-Hata behandelt werden.
9. No. 5015. Vor drei Jahrenluetische Infektion. Seit zwei Hg-Kuren hatte er wenig Erscheinungen. Soll mit Ehrlich-Hata behandelt werden.

Bei zwei Fällen, die mit Wassermann negativ reagierten und bei denen die Epiphaninreaktion zweifelhaft war, wurde angegeben:

No. 5009. Abgeheiltes Ulcus und fast verheilte Bubo inguinalis. Ulcus als molle aufgefaßt, aber wegen glatter Verheilung des Bubo suspekt auf Lues.

No. 5101. Aniridia congenita.

Betrachtet man die Krankengeschichten der genannten neun Fälle mit sicher positiver Reaktion näher, so ergibt sich das Resultat, daß in allen Fällen klinisch eine Lues vorliegt, entweder eine hereditäre, eine mehrere Jahre zurückliegende oder eine frische Infektion. Bei einigen Fällen war der Wassermann vor einiger Zeit zunächst positiv, nach Behandlung mit dem Ehrlich-Hataschen Mittel aber negativ geworden, während die Epiphaninreaktion positiv blieb. Die beiden Fälle mit zweifelhafter Reaktion können nicht mit Sicherheit als syphilitisch aufgefaßt werden. Es sei dahingestellt, ob die beiden Fälle gegen die Reaktion sprechen müssen, denn es kann nicht mit Sicherheit behauptet werden, daß Syphilis völlig ausgeschlossen ist. Man muß bei der Epiphaninreaktion, wie bei jeder anderen biologischen Reaktion stets bedenken, daß sie zurzeit wenigstens noch nicht die Exaktheit eines chemischen Versuches besitzt und daß unbekannte Körper unter Umständen störenden Einfluß auf ihren Verlauf haben können. Ohne umfassende Versuche an großen Reihen von Sera läßt sich hierüber noch kein endgültiges Urteil fällen.

Eine größere Zahl von Sera, die von anderen Infektionskrankheiten stammten, gab diese Reaktion nicht. Es wurden untersucht 12 Fälle von Typhus, 2 von Paratyphus, 8 von Tuberkulose, 2 von Scharlach, Gonorrhoe, je 1 Fall von Erysipel, Masern, Diphtherie, sämtliche mit gleichem negativen Ergebnis. Weiterhin war die Reaktion negativ bei 6 tuberkulösen und 6 gesunden Meerschweinchen, sowie 2 Kaninchen.

Brauchbar dürfte sich diese Methode vielleicht zu einer exakteren Bewertung der Immunitätsvorgänge bei Syphilis erweisen, da zu ihrer Anstellung nicht so viele, in ihrem Verhalten unbekannte Stoffe nötig sind wie bei der Wassermannschen Reaktion. Die einzigen Unbekannten in der Reaktion sind Extrakt und Serum. Ersterer läßt sich an einer größeren Zahl von Sera auswerten, und es wird möglich sein, eine Art von Standardextrakt herzustellen, gegen den anderweitig gewonnene Extrakte und damit auch an anderen Orten zur Untersuchung kommende Sera weiter ausgewertet werden können. Man könnte bei Verwendung eines Standard-extraktes die Reaktion einer Gleichung mit einer Unbekannten vergleichen, und es wäre möglich, soweit bei serologischen Vorgängen von Exaktheit gesprochen werden kann, genau zahlenmäßig durch Austitrieren der Verschiebung des Neutralpunktes mit Barytlösung einen Wert für die stattfindenden Immunitätsvorgänge festzulegen. Die folgende Tabelle gibt ein Bild der verschiedenen Werte, die bei 19 Sera erhalten wurden. Sie zeigt erhebliche Schwankungen gegen den Neutralpunkt. Es hat den Anschein, daß behandelte (besonders mit dem Ehrlich-Hataschen Mittel) Fälle einen geringeren Titer im Vergleich zu frischen Infektionen haben. Ein Parallelgehen mit der Wassermannschen Reaktion findet hierbei offenbar nicht statt, da z. B. ein Fall mit negativem Wassermann einen Titer von 0,25 zeigt. Ob man Schlüsse aus der Größe des Titers auf Prognose und Behandlung ziehen kann, in welchem Zusammenhang der Titer mit der Schwere der Erkrankung steht etc., müssen weitere umfassende Versuche lehren. Hier soll nur auf die Möglichkeit einer exakten quantitativen Auswertung hingewiesen werden.

Quantitative Auswertung der Sera.

No.	Journal-No.	Krankengeschichte	W. R.	Quantitativer Ausfall der Reaktion
1	5137	Am 26. August Hata 606, darauf W. R. negativ. Jetzt verschiedene Ulcera im Gesicht.	—	— 0,1
2	5100	Juni 1909 Schmierkur, August 1909 Einspritzung.	—	— 0,1
3	5147	Atrophia optici.	—	— 0,15
4	4728	Vor fünf Jahren verdächtiges Ulcus exzidiert, seither keine Behandlung und Symptome.	—	— 0,15
5	5091	Iritis, tbc.?	—	— 0,35
6	5126	Lues II. 17. Sept. Ehrlich-Hata.	+	+ 0,05
7	5111	Lues II.	+	+ 0,05
8	5112	Behandlung mit Ehrlich-Hata.	+	+ 0,05
9	5134	Lues seit 1 1/2 Jahren, 3 Hg-Kuren, Geburt eines ausgetragenen Kindes, sehr anämisch und Rhinitis, Mutter nur Plaques an den Tonsillen.	+	+ 0,05
10	4607	Infektion 1901, eine Schmierkur, ulzeröses Hautsyphilid.	+	+ 0,1
11	5156	Seit 14 Tagen induriertes Ulcus. Spirochäten positiv.	+	+ 0,1
12	5123	Vor 14 Tagen Infektion.	—	+ 0,1
13	5120	Lues recens, Exanthem.	+	+ 0,15
14	5114	Taboparalyse.	+	+ 0,2
15	5157	Behandlung Ehrlich-Hata. Anscheinend Rezidiv am Finger (nässende Papel).	+	+ 0,2
16	5159	Infektion vor 6 Wochen, Geschwür geheilt. Praeputium induriert.	+	+ 0,2
17	5122	Vor 14 Tagen Infektion. Geschwür am Dorsum penis.	—	+ 0,25
18	5190	Mann luetisch, nie deutliche Symptome von Lues, gelegentlich Halsschmerzen.	+	+ 0,25
19	5132	Geschwür an Oberlippe, luetischer Primäraffekt?	+	+ 0,25

Zusammenfassung. Mit der Modifikation der Weichardtschen Epiphaninreaktion ließen sich bei einer größeren Zahl von Sera bestimmte Antikörper gegen Syphilis nachweisen.

Die Reaktion ist anscheinend spezifisch, d. h. sie tritt nur bei Zusammentreffen von Syphilitikerserum und syphilitischem Organextrakt ein, während sie mit Meerschweinchenherzenextrakt nicht zu erhalten ist.

Der Ausfall der Wassermannschen Reaktion stimmt fast immer mit dem Ergebnis der Epiphaninreaktion überein. Niemals war die Reaktion bei positivem Wassermann negativ. In einer Zahl von Fällen mit negativem Wassermann war die Reaktion positiv, hier ließ sich aber stets klinisch eine sichere Luesinfektion (meist im Frühstadium) nachweisen.

Es ist wahrscheinlich möglich, mit dieser Reaktion exakte

quantitative Bestimmungen der Immunitätsvorgänge bei Syphilis vorzunehmen.

Für etwaige Nachprüfungen sei an dieser Stelle nachdrücklich betont, daß die Reaktion nur bei sorgfältigstem Arbeiten unter allen Kautelen ausgeführt werden darf, wenn sie einen Anspruch auf Zuverlässigkeit haben will. Werden diese Punkte nicht berücksichtigt, so ist eine exakte Diagnosenstellung nicht möglich, und die Reaktion wird häufig zu Fehl-diagnosen führen. Es ist daher zu warnen, diese Reaktion praktischen Diensten brauchbar zu machen, bevor an einer großen Zahl von Fällen ihre Brauchbarkeit nachgeprüft und erprobt ist.

Literatur: 1. Weichardt, Zentralblatt für Bakteriologie. Referate, Bd. 42, Beiheft S. 148. — 2. Ascoli, Münchener medizinische Wochenschrift 1910, No. 2. — 3. Kraus und Amiradzi, Zeitschrift für Immunitätsforschung, Bd. 6, H. 1, S. 16. — 4. Weichardt, Zeitschrift für Immunitätsforschung, Bd. 6, H. 4. — 5. Schroen, Münchener medizinische Wochenschrift 1910, No. 38.