

Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern.

## Untersuchungen über Komplementbindung bei Recurrenserkrankungen des Menschen und experimenteller Recurrens-Spirochätose der Mäuse und Ratten.

Von Prof. Dr. W. Kolle, Direktor des Instituts, und Dr. P. Schatilloff, Priv.-Doz. an der Universität in Charkow.

Die Frage der Komplementbindung bei Recurrens-Spirochäten mit dem spezifisch wirkenden Recurrens-Immunserum ist von aktuellem Interesse, seitdem sich die Bordet-Gengou'sche Versuchsanordnung nach den grundlegenden Versuchen von A. Wassermann, A. Neisser und Sachs für die Sero-diagnostik der Syphilis — einer chronischen Spirochätenkrankheit — so bewährt hat.

Von der Spezies *Spirochaeta Obermeieri* sind wir gezwungen auf Grund der Untersuchungen von Dutton, R. Koch, C. Fränkel, Uhlenhuth und Händel, Novy und Knapp drei verschiedene Typen anzunehmen:

1. Typus *africanus* Dutton, Erreger des afrikanischen Zeckenfiebers, das namentlich von R. Koch genau beschrieben wurde.

2. Typus *americanus*, welcher nach den Untersuchungen von Novy und Knapp, Kinghorn und Breinl in Amerika als Erreger des Recurrens in Frage kommt.

3. Russischer Typus, welcher mit dem von Obermeier entdeckten identifiziert werden muß und als Typus Obermeieri zu bezeichnen ist.

Die drei Spirochätenstämme unterscheiden sich nicht nur durch die Differenzen, welche klinisch die von ihnen hervorgerufenen Krankheiten darbieten, sondern auch morphologisch, wie aus den Untersuchungen von C. Fränkel und Uhlenhuth hervorgeht. Ferner lassen sie sich durch die Agglutination mittels spezifischen Serums und durch die bakteriziden Eigenschaften, welche das Immunserum in der Bauchhöhle von Ratten und Mäusen entfaltet, differenzieren. Denn das Recurrens-Immunserum besitzt nach den Untersuchungen von Uhlenhuth, Händel, C. Fränkel und Manteufel spezifische agglomerierende Eigenschaften gegenüber den homologen Spirochäten, sodaß z. B. das mit afrikanischen Spirochäten an Affen hergestellte Immunserum nur auf die Spirochäten des afrikanischen Zeckenfiebers, nicht aber auf die europäischen Spirochäten im Reagenzglase oder Tierkörper einwirkt. Aktiv mit einer Spirochätenart immunisierte Tiere sind nur gegen diese völlig immun geworden, während die Immunität gegenüber den anderen Typen eine viel geringere oder fehlende ist. Auf diese Weise konnte C. Fränkel namentlich Differenzen zwischen dem afrikanischen und russischen Typus nachweisen, dagegen ergab sich ein geringfügiges Uebergreifen der aktiven Immunität bei den mit amerikanischen und russischen Stämmen immunisierten Tieren.

Es lag nahe, die Bordet-Gengou'sche Versuchsanordnung auch bei den Recurrenskrankheiten zu benutzen, um auf diese Weise vielleicht einen näheren Einblick in das Wesen der von Wassermann, A. Neisser und Bruck für die Diagnostik der Syphilis empfohlenen Reaktion zu erlangen. Es ist bezüglich dieser Reaktion noch keine Einigkeit über die Natur des Antikörpers und ebensowenig über die Frage erzielt, worin eigentlich das Antigen besteht; auch die Spezifität der Reaktion wird noch von vielen Seiten bestritten.

Unsere Versuche wurden zunächst mit Mäusen, welche künstlich mit Spirochäten<sup>1)</sup> infiziert waren, angestellt. Nachdem die Tiere einen Anfall der Krankheit mit Vermehrung der Spirochäten im Blut überstanden hatten, wurden sie noch ein- bis zweimal mit spirochätenhaltigem Mäuseblut intraperitoneal in Zwischenräumen von 6—7 Tagen gespritzt. Zum Zwecke der Komplementbindungs-Versuche wurde Serum gewonnen erstens während der Krankheit und zweitens nach Ueberstehen der Krankheit in wechselnden Zeiträumen, nach vier bis acht

<sup>1)</sup> Für die Ueberlassung des Spirochätenmaterials sind wir Herrn Geheimrat C. Fränkel zu aufrichtigem Danke verpflichtet.

Tagen und nach drei bis vier Wochen. Als Antigen dienten teils frische spirochätenhaltige Organe, welche mit physiologischer Kochsalzlösung zerrieben waren, teils gleichfalls mit NaCl-Lösung hergestellte Organextrakte in trockenem Zustande, teils frisches spirochätenreiches Blut von Mäusen und Ratten in flüssiger Form. (1:4 0,35 % NaCl.)

Die Experimente wurden sowohl mit fallenden Dosen Antigen wie mit fallenden Dosen Serum angestellt. Es wurden ungefähr 150 Versuche ausgeführt, jedesmal unter Heranziehung von zahlreichen Kontrollen. Zur Hämolyse diente ein von Kaninchen durch Vorbehandlung mit Hammelblut gewonnenes hämolytisches Serum vom Titer 1:500 (0,002). Als Komplement benutzten wir ein frisches Meerschweinenserum und zwei- bis dreimal gewaschene Hammelblutkörperchen. Wir geben als Beispiel für die Versuchsanordnung und die gewählten Dosen das folgende Protokoll wieder:

Tabelle I.

Versuche mit Mäuse-Spirochäten-Immunserum und Mäuseblutextrakten. Komplementbindung tritt nicht ein.

Sera	Mäuse-Immunserum Afrikanischer Stamm (Liverpool)			Mäuse-Immunserum Amerikanischer Stamm			Mäuse-Immunserum Afrikanischer Stamm (Paris)		
	Afrikanischer Stamm (Liverpool)	Amerikanischer Stamm	Afrikanischer Stamm (Paris)	Afrikanischer Stamm (Liverpool)	Amerikanischer Stamm	Afrikanischer Stamm (Paris)	Afrikanischer Stamm (Liverpool)	Amerikanischer Stamm (Paris)	Afrikanischer Stamm (Paris)
0,5	○ <sup>1)</sup>	○	○	○	○	○	○	○	○
0,2	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,10	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,05	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,02	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Serum konstant 0,1 ccm.

Blutextrakte (1:4 einer 0,85 % NaCl-Lösung) in fallenden Dosen.

Komplement 0,05 ccm.

Hämolytisches Serum 0,004 (doppelter Titer).

Schafblut (zweimal gewaschen) 1 ccm einer 5 % Blutkörperchenaufschwemmung

Auf Grund der zahlreichen, über mehrere Monate sich erstreckenden Versuche kamen wir zu der Schlußfolgerung, daß eine Komplementbindung zwischen Mäuse-Immunserum und spirochätenhaltigen Organen oder Blut nicht eintritt. Auch gelang es weder eine agglomerierende, noch eine antiparasitäre Wirkung der Mäuseimmunsera gegen die homologen oder heterologen Stämme *in vitro* zu konstatieren. Im Gegenteil, die Spirochäten blieben im hängenden Tropfen während 16 Stunden sowohl im Mäuseimmunserum wie im Normalmäuseserum beweglich, während *in vivo* das Ueberstehen einer Infektion Immunität gegen den homologen Stamm bedingte.

In der Annahme, daß das Fehlen komplementbindender Substanzen im Serum von Mäusen, welche immun gegen die Spirochäten gemacht waren, im Zusammenhang mit der gewählten Tierart stand, wandten wir uns den Ratten zu. Es wurde das Serum von Ratten, die künstlich mit den verschiedenen Stämmen der Recurrensspirochäten infiziert waren, in gleicher Weise gewonnen und untersucht. Auch hier wurde das Serum von Ratten, das während der Krankheit entnommen war, sowie Rekonvaleszentenserum zum Teil von solchen Tieren, welche mehrmals intraperitoneal gespritzt waren, benutzt. Als Antigen dienten Ratten- und Mäuseorgane sowie Ratten- und Mäuseblut, in welchem sehr viele Spirochäten nachgewiesen waren. Die Versuchsanordnung und die Dosierung des Serums und des Antigens war die gleiche wie bei den Mäuseversuchen. Es wurden mit Rattenserum im ganzen mehr als 50 Versuche angestellt, stets mit negativem Resultat. Die Recurrensspirochäten-Sera besaßen keine stärkere komplementbindende Kraft als normales Rattenserum gegenüber dem Spirochäten-Antigen. Alle 24 verschiedenen Sera (von Mäusen und Ratten, die eine Infektion mit afrikanischen Stämmen aus (Liverpool und Paris) oder amerikanischen Stämmen durchgemacht hatten und deren Sera, teils durch Erwärmung auf 56° C während 30 inaktiviert, teils nicht inaktiviert waren, wurden gegen neun verschiedene Extrakte geprüft, aber überall mit negativem Resultat. Die Extrakte waren entweder aus frischen

1) ○ vollkommene Hämolyse.

oder aus getrockneten Organen (Leber und Milz) sowie aus frischem Blut mit einem reichlichen Gehalt an Spirochäten gewonnen. Die Rattenimmunsera besaßen, trotzdem sie kein Komplement verankerten, parasitizide Eigenschaften gegenüber dem homologen Spirochätenstamm, wie wir mittels des Pfeiffer'schen Versuchs feststellen konnten, das amerikanische Immunserum gegenüber den amerikanischen Spirochäten etc.

Nach Abschluß dieser Versuche erschien die im Kaiserlichen Gesundheitsamt zu Berlin angefertigte Arbeit von Manteufel, der mit Organextrakten bei der Hühnerspirillose und bei der experimentellen Recurrens-Infektion der Ratten zu gleichen negativen Resultaten bezüglich der Komplementbindung gekommen ist wie wir. Er hat allerdings an Mäusen keine Versuche angestellt. Auch bei Benutzung von Blutextrakten waren seine Resultate negativ bezüglich der Spezifität und keineswegs befriedigend. Es ließ sich mit Hilfe der Rekonvaleszenten-Immunsera von Ratten eine Differenzierung der drei Typen der Spirochäten nicht herbeiführen. Manteufel faßt die Ergebnisse seiner Versuche dahin zusammen, daß er „häufig Resultate gehabt, die im Sinne einer Spezifität der Reaktion zu sprechen scheinen“, und daß „die Extrakte aus Recurrensblut wechselseitig mit allen drei verschiedenen Formen von Recurrens-Immunsera Komplementbindung ergaben, und in ungefähr gleich hohem Grade“. Auf Grund unserer sehr zahlreichen und quantitativ genauen Untersuchungen, die mit viel mehr Abstufungen der Dosen, als es Manteufel tat, arbeiteten, müssen wir das Auftreten von komplementbindenden Substanzen im Serum von Ratten bezweifeln.

Trotz dieser negativen, mit Ratten- und Mäusespirochäten-Immunserum erhaltenen Resultate beschlossen wir, Versuche mit Serum von Menschen, die an Recurrens erkrankt waren oder die Krankheit überstanden hatten, anzustellen.

Das hierfür notwendige Material wurde uns auf unsere Bitte von den Herren Dr. Blumenthal in Moskau, Privatdozent Dr. Svenson in Kiew und Dr. Bereskin in Moskau bereitwilligst zur Verfügung gestellt; wir danken den Genannten bestens für ihr Entgegenkommen.

Von den Herren Blumenthal und Bereskin wurde uns auch spirochätenhaltiges Blut von recurrenskranken Menschen überlassen. Wir waren in der Lage, das Serum von vier Kranken sowie drei Rekonvaleszentenserum mittels der Bordet-Gengou'schen Methode auf komplementbindende Substanzen untersuchen zu können. Als Antigen dienten spirochätenhaltige Blutgerinnsel von recurrenskranken Menschen, ebenso Organe und Blut der mit afrikanischer bzw. mit amerikanischer Recurrens infizierten Mäuse und Ratten, welches reichlich Spirochäten enthielt. Die Ausführung der Versuche war die gleiche, wie sie oben angegeben ist.

Zu unserer Ueberraschung konnten wir bei wiederholten Versuchen nun eine ausgesprochene Komplementbindung, und zwar nur mit Blut von Rekonvaleszenten feststellen, welche zwei Anfälle überstanden hatten. Dagegen zeigte das Serum, welches von fiebernden Recurrenskranken stammte oder nach

Tabelle II.

Spezifische Wirkung des russischen Rückfallfieberserums, gewonnen vom Menschen neun Tage nach dem zweiten Fieberanfall. Komplementbindung positiv mit russischer Recurrens, negativ mit amerikanischer und afrikanischer.

Blutextrakte (1:4 0,85 % NaCl)	Menschliches Rekonvaleszentenserum (Kiew)			
	Afrikanischer Stamm (Liverpool)	Amerikanischer Stamm	Afrikanischer Stamm (Paris)	Russischer Stamm
Antigen in fallenden Dosen.				
0,5	+	++	+	++
0,2	○	○	○	++
0,1	○	○	○	++
0,05	○	○	○	++
0,02	○	○	○	+

Serum konstant 0,1.

Blutextrakt in fallenden Dosen.

Komplement 0,05.

Hämolytisches Serum 0,004.

Blut 0,05.

1) ++ absolute Hemmung.

+ deutliche Hemmung.

○ wenig deutliche Hemmung.

○ Spur von Hemmung.

○ Hämolyse.

Tabelle III.

Bindungskraft des normalen Menschenserums, verglichen mit derjenigen von Rückfallfieberkranken und Rekonvaleszenten gegenüber Blutextrakten von russischen Stämmen.

Extrakte	Normalserum N I	Normalserum N II	Krankenserum (Kiew-Svenson)	Rekonvales- zentenserum (Kiew-Svenson)	Krankenserum (Blumenthal- Moskau)	Krankenserum (Bereskin- Moskau)	Rekonvales- zentenserum N I (Bereskin- Moskau)	Rekonvales- zentenserum N II (Bereskin- Moskau)
0,5	○	○	○	++	○	○	++	++
0,2	○	○	○	++	○	○	+	++
0,1	○	○	○	++	○	○	+	+
0,05	○	○	○	++	○	○	○	○
0,02	○	○	○	●	○	○	○	○

Serum konstant 0,1 (inaktiviert 56° C 30').

Blutextrakt (1:4 einer 0,85% NaCl-Lösung) in fallenden Dosen Komplement 0,05; Hämolytisches Serum 0,004; Blut 0,05.

dem ersten Anfall während der Rekonvaleszenz entnommen war, absolut keine spezifischen, komplementbindenden Fähigkeiten. Wie aus den folgenden Versuchsprotokollen hervorgeht, ist die komplementbindende Eigenschaft des Recurrensserums, gewonnen von Recurrensrekonvaleszenten nach dem zweiten Anfall, eine streng spezifische. Sie tritt nämlich nicht zutage gegenüber den amerikanischen und afrikanischen Spirochäten, sondern nur gegenüber dem russischen Stamm.

**Schlußfolgerungen.** Die von uns ermittelten Tatsachen zeigen also die Brauchbarkeit der Komplementbindungsmethode nicht nur für die Differenzierung der verschiedenen Typen der Recurrensspirochäten mittels menschlichen Immunserums, sondern auch für die nachträgliche Diagnose der Krankheit beim Menschen. Von Wichtigkeit, auch für die Theorie und das Verständnis der Syphilisreaktion ist ferner die Tatsache, daß bei experimentell mit Spirochäten infizierten Mäusen und Ratten, Tierarten, bei denen Recurrens als spontane Krankheit nicht vorkommt, komplementbindende Stoffe trotz zahlreicher Versuche nicht nachgewiesen werden konnten. Die Vermehrung der Spirochäten im Körper dieser Tiere kann bei der ersten Infektion eine sehr starke sein, während die Krankheitserscheinungen nicht dementsprechend stürmische sind. Beim Menschen waren während des ersten und zweiten Rückfallfieberanfalles die komplementbindenden Stoffe gleichfalls nicht nachweisbar, wohl aber nach Ablauf von mindestens zwei Anfällen. Bei Syphilis des Menschen und Affen treten die komplementbindenden Stoffe bekanntlich sehr bald nach der Infektion auf und oft noch vor Ausbruch der Allgemeinerscheinungen. Unseren weiteren Untersuchungen, die aus Mangel an Material bisher nicht ausgeführt werden konnten, muß die Feststellung vorbehalten bleiben, ob hier ein gesetzmäßiges Verhalten für das Auftreten der komplementbindenden Stoffe beim menschlichen Rückfallfieber vorliegt. Es ist ferner zu prüfen, ob diese Methode prognostisch zu verwerten ist bezüglich des Auftretens neuer Anfälle; denn die klinischen Merkmale lassen für die Voraussage neuer Anfälle im Stich.

Das Fehlen der komplementbindenden Antikörper im Serum von Ratten, das Schutzwirkung gegenüber der experimentellen Recurrens entfaltet, spricht für die auch bei anderen Krankheiten und ihren Erregern von Neufeld, Hüne, Händel, Krumbein und Schatilloff auf Grund der Versuchsergebnisse gemachten Annahme, daß die komplementbindenden Stoffe Antikörper sui generis sind. Mit der Auffassung, daß die komplementbindenden Antikörper von den bakteriziden und bakteriotropen Substanzen zu trennen sind, steht auch die Tatsache im Einklang, daß das Serum von syphilitischen Menschen und Affen trotz seines Gehaltes an komplementbindenden Antikörpern keine Schutz- oder Heilstoffe, wie A. Neisser, Finnger und Landsteiner experimentell nachwiesen, enthält.

**Literatur.** Gabritschewsky, Annales Pasteur 1896. — Novy and Knapp, Journal of infect. diseases 1906. — C. Fraenkel, Berliner klinische Wochenschrift 1907. — Derselbe, Hygienische Rundschau 1907. — Derselbe, Münchener medizinische Wochenschrift 1907. — Neufeld und v. Prowazek, Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1907. — Hödlmoser, Zeitschrift für Heilkunde 1905. — R. Koch, Berliner klinische Wochenschrift 1906. — Sobernheim, Handbuch von Kolle und Wassermann, Suppl.-Band. — Breinl, Kinghorn und Todd, Mem. of the Liverpool school. — Breinl und Kinghorn, Lancet 1906. — Uhlenhuth und Händel, Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte 1907. — Manteufel, ibidem. 1908.