

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Innsbruck. — Vorstand: Professor Loos.)

Eine Modifikation der WaR.

(Mikromethode und deren Bedeutung für die Kinderklinik.)

Von

Dr. Niederwieser und Dr. Lauter

(Klin. Assistent)

(Volontärassistent
d. Univ.-Hautklinik).

(Eingegangen am 4. Mai 1928.)

Es ist eine lang bekannte Tatsache, daß die serologische Untersuchung syphilitisch verdächtiger Kinder recht oft auf Schwierigkeiten stößt, und zwar aus dem einfachen Grunde, weil die nötige Blut- bzw. Serummenge nicht erhältlich ist. Die Venenpunktion ist besonders aus rein anatomischen sowie praktischen Gründen bei einem Großteil der Kleinkinder und Säuglinge unmöglich und zu einer Sinuspunktion oder Ähnlichem wird sich nicht jeder und insbesondere nicht der Praktiker, der seine Diagnose bei zweifelhaften Fällen ebenfalls auf das serologische Ergebnis stellt, entschließen wollen. Durch Einstich in die Fingerbeere oder in das Ohrfläppchen werden gewöhnlich auch nach Hyperämisierung nur unzureichende Blutmengen gewonnen — unzureichend wenigstens für die Anstellung einer der üblichen WaR.

Die hiesige Kinderklinik hat sich aus obigen Gründen in solchen Fällen bisher der von *Dohnal* 1923 angegebenen, von *Niederwieser* noch vereinfachten Mikro-Meinickemethode mit Erfolg bedient. Wenn sich auch diese Methode bestens bewährt hat und deren Resultate, wie bereits *Feuerstein* in seinen letzten Untersuchungen über 4000 Fälle mitgeteilt hat, mit der klinischen Diagnose weitgehendste Übereinstimmung zeigten, so war es doch aus begreiflichen Gründen als eine große Lücke empfunden worden, daß der Mikro-M. R. bisher keine wesensgleiche WaR. als Partnerin zur Seite gestellt werden konnte.

Nun benötigt man für die Anstellung der WaR. selbst nach der von *Müller-Landsteiner* modifizierten Methode, die in Österreich sehr beliebt ist, eine Serummenge von mindestens 3 Tropfen (1 Tropfen entspricht 0,2 ccm). Sie wird auf der hiesigen serologischen Station der Dermatologischen Klinik ausgeführt und erfreut sich dort seit Jahren der größten Verlässlichkeit. Man braucht zur Anstellung derselben ungefähr mindestens 2 ccm Blut. Gewiß wird man entgegen können, daß sich diese Menge auch gewinnen läßt, ja — aber bei Kindern nur oft durch um-

ständige oder sogar gefahrvolle Methoden und dann insbesondere nie beliebig oft.

Die Frage, die wir uns vorlegten, war, ob es nicht möglich wäre, mit geringeren Serummengen und doch gleicher Verlässlichkeit diese Reaktion durchführen zu können. Als solches Ideal schwebte uns die Blutmenge eines Capillarröhrchens vor Augen, das infolge seiner auch übrigen glänzenden Eigenschaften (Sterilität, selbsttätiges Aufziehen des Blutes, leichter Versand, rationelle Serumgewinnung usw.) uns aus unseren langjährigen Mikro-M.R. bekannt war.

Natürlich war dabei auch wieder zu bedenken, daß wie aus den Arbeiten von *Leredde*, *Rubinstein*, *Bruck*, *Müller*, *Boas* u. a. hervorgeht, zu kleine wie zu große Serummengen recht oft unspezifische Reaktionen ergeben können. Modifikationen dieser Art wurden schon vor uns von anderen empfohlen; so erwähnen wir nur *Sormani*, *Weidanz*, *Halle-Pribram*, *R. Müller*, *Landsteiner*, *Berckzeller*, *Nohlen*, *Ball* u. a. Die Abmessung der einzelnen Reagenzien erfolgte dabei mittels Capillarpipetten, Tropfen oder Melangeuren. Keine dieser Mikromethoden hat sich, wohl größtenteils wegen der Kompliziertheit, die teils in der Apparatur, teils in der Technik gelegen war, eingebürgert und wurde auch deshalb von uns nicht weiter versucht. Bekanntlich braucht man zur Ausführung der von *Müller-Landsteiner* modifizierten Wassermannmethode folgende Bestandteile:

1. Blutkörperchen . . . gewaschene Hammelblutkörperchen 50%.
2. Amboceptor . . . Immunserum von Kaninchen (gegen Hammelblut).
3. Komplement . . . frisches Meerschweinchenserum + Komplement des zu untersuchenden Menschenserums.
4. Extrakt alkohol. Rinderherzextrakt (C-Extrakt).
5. Aktives Serum.

Alle diese hier angeführten Bestandteile mußten nun miteinander in der Weise in Übereinstimmung gebracht werden, um auch mit kleinen Mengen menschlichen Serums die Reaktion in derselben Weise und mit derselben Exaktheit und Sicherheit ausführen zu können, wie man sie aus der Müller-Landsteinerschen Methode kennt. Im nachfolgenden soll nun dieser Weg, den wir gegangen sind, um zu dem gesteckten Ziele zu gelangen, in Kürze geschildert werden.

Am einfachsten und aussichtsreichsten erschien uns der Weg, durch zweckmäßige Gewinnung des Patientenserums und insbesondere durch primäre Verdünnung desselben, unter entsprechender Einstellung der übrigen Reagenzien der WaR. dieselbe dann sozusagen im verkleinerten Maßstabe auszuführen. Die Schwierigkeit, die sich der Serumgewinnung aus den kleinen Blutmengen entgegenstellten, ließen sich relativ leicht überwinden. Der ohne Pressen aus der Fingerbeere entnommene Blutstropfen wird von selbst durch Capillarwirkung in die Capillare aufgezogen. Die Größe der Capillarröhrchen entspricht dem von *Dohnal* zu

seiner Mikromethode angegebenen, also 0,1–0,2 mm lichter Weite und etwa 10 cm Länge. Ein etwa $\frac{1}{2}$ –1 cm leer gebliebenes Ende wird frei gelassen und dann mittels Flamme verschlossen. Nach einiger Zeit setzt sich ein Fibringerinnsel ab, welches mittels einer feinen Platinnadel im ganzen herausgezogen wird. Sehr zu beachten ist dabei, daß die Blutsäule beim Aufziehen des Blutes in die Capillare keine Unterbrechung durch eine Luftblase erhält, da sonst ein Teil des Fibringerinnsels zurückbleibt. Das nun mehr oder minder von Blutkörperchen durchsetzte Serum wird in eine für diesen Zweck leicht abzuändernde Zentrifuge gebracht. Besonders praktisch hat sich uns dafür eine kreisförmige Pappscheibe (Karton) bewährt, deren einzelne radspeichenartig gegen das Zentrum verlaufende Rillen, in die die Capillaren zu liegen kommen, mit einer zweiten Kartonlage bedeckt werden. So wird einerseits das Hinausschleudern der Capillaren verhindert, andererseits eine den Rillen entsprechende Numerierung der Capillaren ermöglicht. Diese Scheibe zeigt eine zentrale Bohrung mit eingelassenem, eingekerbtem Röhrenansatz, welcher genau auf die Zentrifugenachse paßt und daher sogleich ohne Schwierigkeiten statt der Epruvettenwage ausgetauscht werden kann. Ein Tropfen des auf solche Art ökonomisch gewonnenen Patientenserums wurde nun aus der Capillare auf eine 0,85proz. Na-Cl-Basis von 1,98 ccm gebracht, d. h. mit demselben primär verdünnt. Dann wird ein Tropfen Komplement (ein solcher Capillartropfen entspricht etwa 0,03–0,05 ccm Serum bzw. Komplement) aus einer Pipette mit Capillarendigung hinzugebracht und diese Mischung in je 3 gleiche Teile (je 0,66) aufgeteilt. Selbstverständlich war es für uns klar und stand zu erwarten, daß auch die übrigen Reagentien in gleicher Weise vermindert bzw. verdünnt werden mußten, um richtige Resultate zu erzielen. Entsprechend unseren in 3 Teile geteilten Serumtropfen, war es daher notwendig, Komplement (wie bereits oben ausgeführt), Antigen und Amboceptor in gleicher Weise zu ermitteln. Bei Komplement und Amboceptorauswertung war dies ohne weiteres ausführbar. Bei der Austitrierung des Amboceptors hielten wir uns genau an die Vorschriften, wie sie uns *Müllers* Tropfenmethode lehrt. Sie erfolgte selbstverständlich aus einer Capillare bzw. mit Capillarendigung versehenen Pipette, wie alle unsere in *Tropfen* zugesetzten Reagenzien. Es waren also Amboceptorverdünnungen herzustellen mit steigenden Kochsalzmengen und diejenige Verdünnung zum abschließenden Versuche zu verwenden, die vollständige Lysis der Hammelblutkörperchen ergibt.

Ungleich größere Schwierigkeiten ergaben sich bei der Bestimmung der erforderlichen Antigenmengen. Es war von vornherein zu befürchten, daß bei so kleinen Mengen von Serum und Komplement die antikomplementäre Wirkung überschüssiger Antigenmengen den Verlauf der Reaktion stören könnte. Unsere diesbezüglich angestellten ersten Versuche

scheiterten gerade an der Antigenauswertung. Fügten wir, wie anfangs nur 2, 3, 4 Antigentropfen zum reagierenden System, so fanden wir sowohl Antigenkontrolle als auch die eigentlichen, die Antigenmengen enthaltenden Röhrchen trüb, also eine Hemmung der Hämolyse. Es mußte also die Antigenfrage von einem anderen Gesichtspunkt als beim Serum gelöst werden. Das Antigen muß in fallenden bzw. steigenden Mengen an Hand der mit Serum und Komplement beschickten Kochsalzmengen ausgewertet werden. Dabei kommt es bei minderwertigen Extrakten sogar zur Teilung eines Antigentropfens, wobei ein halber Tropfen den Anfang in der steigenden Antigenmenge macht. Unsere Versuche beschäftigten sich auch mit der Frage der Na-Cl-Basis. Zu hohe Verdünnungen ergaben, daß ein Ablesen der Reaktionen dann nicht mehr möglich war, wenn die Na-Cl-Menge so beibehalten wurde, wie sie für die Originalmethode angegeben worden ist. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, auch hier auf ein Drittel der obigen Na-Cl-Basis herabzugehen. Mit dieser Zusammenstellung war es uns möglich, brauchbare Resultate zu erzielen, verglichen mit den Resultaten der auf der serologischen Station der Hautklinik geübten, von R. Müller modifizierten WaR. und mit der auf hiesiger Kinderklinik gemachten Mikro-M.R. nach *Dohnal*, wobei sich nur geringe Differenzen zeigten, welche ins Bereich jeder Vergleichsuntersuchung fallen.

Ehe wir zur eigentlichen Beschreibung des Versuches übergehen, lassen wir eine Tabelle folgen, die sich über die Blutuntersuchungen von 500 Patienten aus der serologischen Station der hiesigen Hautklinik, der Kinderklinik, der Infektionsabteilung und einigen wenigen von auswärts eingeschickten Blutproben erstreckte. Vom allergrößten Teil der Patienten war daher auch das klinische Krankheitsbild genau bekannt, so daß durch die klinische Diagnose eine gute Stütze und Beweiskraft für den richtigen Ausfall der Reaktion gewonnen werden konnte.

500 Fälle	+++	++	+	±	Autotrope Fälle	Verschied. Resultate	Negative Fälle
WaR.	41	23	16	4	4	—	412
Mikro-Meinicke-R. . .	49	18	18	3	—	4	412
Modifizierte WaR. . .	42	21	14	1	3	6	416

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, verhalten sich also die WaR., M.M.R. und die Mod. WaR. in bezug auf ihre positiven und negativen Resultate folgendermaßen:

500 Fälle	positive Fälle	negative Fälle
WaR.	20 %	80 %
Mikro-Meinicke-R.	21 %	79 %
Modifizierte WaR.	19 %	81 %

Wir haben also eine Übereinstimmung mit der R. Müller-Originalmethode von über 99% eine Differenz, die in keiner Weise zu verwundern ist, da ja bekannterweise die gleichen Proben mit den gleichen Reagenzien usw. von verschiedenen Fachleuten ausgeführt, bestimmte Differenzen ergeben können. Dies ist daher bei allen Proben und Vergleichen auf die Zuverlässigkeit einer Probe zu berücksichtigen. (Siehe „Rapport de la conférence Technique de Laboratoire“. Tenue à Copenhague, le 19 nov. à 3 déc. 1923.)

Im folgenden geben wir nochmals eine kurze Skizze unserer Arbeitsmethode: Vorauszuschicken wäre, daß wir, wie oben bereits erwähnt, alle in Tropfen hinzugesetzten Reagenzien aus Capillaren bzw. Pipetten mit Capillarendigung hinzufügen, was auch infolge der viel geringeren Abtropffläche (normal 3 mm Durchmesser) eine wesentliche Verkleinerung der Tropfengröße bedingt.

Ein Tropfen des zu untersuchenden, auf obige Weise gewonnenen Serums (wir arbeiten mit aktivem Serum) wird also direkt aus der Capillare in eines der zum Versuche notwendigen Röhrchen (das etwa größeren Blutsenkungsröhrchen entspricht) gebracht, in dem sich eine 0,85proz. Na-Cl-Menge von 1,98 ccm befindet. Diesem Gemisch von Serum und Kochsalzlösung wird ein Tropfen Komplement hinzugefügt. Hierauf erfolgt mittels Pipetten die auf 2 mal 0,66 ccm gereicht sind, die Aufteilung von je 0,66 ccm auf das 2. und 3. Röhrchen. Stellt nun das 1. Röhrchen die Serumkontrolle vor, so erfolgt in beiden letzteren die Hinzufügung von im Vorversuch ausgewerteten, steigenden Antigenmengen — das sind in unserem Falle 1 oder 2 Tropfen, bezogen auf den derzeitigen Titer des uns zur Verfügung stehenden Antigen, das im ersten Vorversuch ausgewertet wurde. Am Schlusse einer bestimmten Versuchsreihe erfolgt die Einstellung einer Antigenkontrolle, die klarerweise sich auch in einem Röhrchen befindet, das eine Menge von 1,98 ccm NaCl und 1 Tropfen Komplement enthält. Nach erfolgter Abpipettierung von 1,32 ccm dieses Gemisches wird die doppelte Extraktmenge, in unserem Falle 2 Tropfen, hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln, was bei allen unseren Vermischungen außerordentlich wichtig ist, kommen die Eproutetten in den Thermostaten bei 37° auf $\frac{3}{4}$ Stunden.

Die Bestimmung der wirksamen Amboceptorverdünnung wird zunächst genau so ausgeführt wie sonst üblich. Da nun unser Hämolyseversuch selbstverständlich wie der Hauptversuch mit gedritteltem Komplement und Hammelblutmengen durchgeführt worden ist, stand zu erwarten, daß mit fallenden Tropfen, d. h. mit zunehmender Verdünnung der einzelnen Amboceptorverdünnungen, die dreifache niedere Verdünnung wie beim Normalversuch die Hämolyse herbeiführen müßte. Z. B. ergab sich wie beim Normalversuch eine Verdünnung von 1 : 30, so wäre an unserem Falle zu erwarten, daß die Verdünnung von 1 : 90

die Hämolyse herbeiführen müßte. Dies traf aber nicht vollständig zu, sondern es ergab sich vielmehr die Notwendigkeit, hier eine eigene Amboceptorauswertung vorzunehmen, da sich oft aus uns unbekannten Gründen kleine Unterschiede bei den Proben ergaben. Zum besseren Verständnis sei nochmals erwähnt, daß wir also eigentlich mit einem fallenden Tropfen der entsprechenden Amboceptorverdünnungen arbeiten, daß jedoch die für unsere Versuche wirksame Verdünnung bedeutend tiefer gelegen ist. Die Hammelblutaufschwemmung wird ebenso auf ungefähr das Dreifache verdünnt, wobei jene Vorschriften zu berücksichtigen sind, die für die normale 50proz. bestehen. Nach $\frac{3}{4}$ Stunden werden die Eprouvetten aus den Thermostaten genommen, jedem Röhrchen der entsprechende Tropfen Amboceptor und Hammelblutverdünnung hinzugefügt und nach kräftigem Schütteln in den Brutofen zurückgegeben. Der Versuch ist dann erst als beendet zu betrachten, also aus dem Brutofen zu entfernen, wenn sowohl Antigen als auch die vom letzten Versuche herrührenden Kontrollproben, wie es sonst üblich ist, vollständige Hemmung bzw. Lösung der Hammelblutkörperchen ergeben.

Unsere Versuche erstreckten sich ferner auf Untersuchungen mit Liquor, von welchem wir 2 Tropfen nahmen. Auch machten wir Untersuchungen mit dem Blaseninhalte von Cantharidenpflaster, den wir zum Nachweis von Spirochäten verwenden. Indem wir ein etwa 1 qcm großes Cantharidenpflaster 12 Stunden auf die Haut klebten und den Inhalt der dadurch erzeugten Blase in eine Capillare aufziehen ließen. Ohne weitere Behandlung wird dann 1 Tropfen des Blaseninhaltes zu obiger WaR. verwendet. Bei über 100 Untersuchungen des Blaseninhaltes verschiedener Patienten zeigte sich völlig gleiche Übereinstimmung mit den Kontrollseren. Dies entspricht also einer neuen, vollständig unblutigen, wenn auch komplizierteren und zeitraubenderen Methode. Ich würde niemand raten, den Weg zur Vornahme der WaR. erst auf dem Umweg über die Cantharidenblase zu nehmen, da man in viel kürzerer Zeit und bequemer mit einem Tropfen Blut arbeitet. Wenn man aber schon einmal zum Nachweis von Spirochäten eine Cantharidenblase erzeugt, so ist der Inhalt derselben noch leicht auch für die jetzt mitgeteilte Reaktion weiterzuverwenden.

Natürlich läßt sich obige Mod. WaR. bei einem und demselben Kind beliebig oft, auch z. B. mehrmals täglich vornehmen, und so zur Lösung verschiedener Probleme verwenden. So häufige Venenpunktionen zu diesem Zwecke mit Verwendung normaler Blutmengen wären völlig undurchführbar. In der Möglichkeit der Ausführung der Serumreaktion (M.M.R. und WaR.) mit nur einer Capillare Blutes liegt der Wert der Probe und die Berechtigung der Mitteilung derselben.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß es uns gelungen ist, mit einer Capillare Blut sowohl die WaR. als auch die M.M.R. ausführen

zu können, und zwar auf einfachste und bereits bewährte Weise und ohne umständliche Apparatur. Auch ist das Einsenden von Blut in Capillaren leichter möglich als in Röhrchen.

Wir wollen mit dieser Modifikation nur das eine erreichen, dieselbe dort zu versuchen, wo man gezwungen ist, mit einer geringen Blut- bzw. Serummenge sein Auslangen zu finden. Dies ist um so begreiflicher, da ja namentlich die durch das Luesvirus geschädigten Säuglinge ohnedies schwer in ihrem hämatopoetischen Apparat geschwächt sind und durch größere Blutentziehungen noch mehr geschädigt würden. Namentlich dann, wenn man sich über den jeweiligen Behandlungsstand öfters orientieren will. Selbstverständlich erlauben wir uns jetzt noch kein abschließendes Urteil zu geben, sondern wollen die Untersuchungen zur Prüfung mitteilen und selbst weiterfortsetzen, um die Zuverlässigkeit und Brauchbarkeit dieser einfachen Methode noch besser erhärten zu können.

Literaturverzeichnis.

Bruck, C., Serodiagnose der Syphilis. II. Aufl., 1924. — *Boas, H.*, Diagnose WaR. 1922. — *Berczeller*, Berl. klin. Wochenschr. **45**. 1917. — *Colmers*, Sero-diagnose of Syphilis. — *Dohnal*, Dermatol. Wochenschr. **34**. 1923. — *Dungern-Hirschfeld*, Münch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 21. — *Feuerstein*, Wien. klin. Wochenschr. **4**. 1927. — *Halle-Pribram*, Wien. klin. Wochenschr. **32**. 1916. — *Müller, R.*, Serodiagnose der Syphilis. 1913. — *Niederwieser*, Dermatol. Wochenschr. **39**. 1924. — *Nohlen-Ball*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **42**. — *Perlmann*, Dermatol. Wochenschr. **57**. — *Sebracés, Eckenstein*, Dermat. Wochenschr. **57**. — *Sormani*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. **11**, H. 2. — *Weidanz*, Berl. klin. Wochenschr. **44**. 1908.
