Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 16 (1960)

Artikel: Neue Wege zur serologischen Diagnose der Mononucleosis infectiosa

Autor: Tomesik, J.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-307446

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 14.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

D. K.: 616.988.55–078

Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Basel
Direktor: Prof. J. Tomcsik

Neue Wege zur serologischen Diagnose der Mononucleosis infectiosa[1]

Von J. Tomcsik

Das Pfeiffersche Drüsenfieber (in dieser Arbeit mit M.i. = Mononucleosis infectiosa bezeichnet) wird im allgemeinen als eine durch ein Virus verursachte Infektionskrankheit aufgefaßt. Diese Auffassung wurde durch einige Versuche unterstützt, in denen es gelang, die Krankheit mit dem Blut bzw. mit dem aufgeschwemmten Lymphdrüsengewebe der kranken Menschen auf gesunde (freiwillige) Personen bzw. auf Rhesus- und Cynomolgusaffen zu überführen (29, 41). Lichtmikroskopische Untersuchungen auf einen sichtbaren Krankheitserreger fielen mit dem Blut und mit den Lymphdrüsen der kranken Menschen in den früheren Versuchen vollkommen negativ aus. *Sohier* und *Tissier* (29) konnten das vermutete Virus in Hühnerembryonen nicht nachweisen. Eine gewisse serologische Verwandtschaft des M.i.-Virus wurde auf Grund von Virushämagglutinationsstudien mit Newcastle-Virus (5, 41) bzw. mit Sendai-Virus vermutet (15, 19).

Einen wesentlichen Schritt in der Abklärung der Ätiologie der M.i. bedeuten die seit 1954 publizierten Arbeiten von *Misao* et al. (16, 17). Es gelang ihnen, M.i. mit dem Blut, mit den Lymphdrüsen bzw. mit dem Knochenmark der kranken Menschen auf Mäuse zu überführen. 11 gesunde Menschen, die mit den Lymphdrüsen der infizierten Mäuse geimpft worden waren, erkrankten nach einer Inkubationsperiode von ca. 12 Tagen an typischer M.i. Bei der experimentellen Infektion konnte im Blut bzw. in den Organen ein Mikroorganismus nachgewiesen werden, welcher eine intermediäre Stellung zwischen Virusarten und Rickettsien einnahm. Die erwähnten japanischen Autoren nannten diesen Mikroorganismus: Rickettsia semetsu.

Unabhängig davon, ob M.i. durch ein Virus oder durch eine Rickettsienart verursacht wird, steht es fest, daß sowohl während der Krank-

[1] Für diese Arbeit wurde ein Beitrag des Arbeitsbeschaffungskredites des Bundes zur Verfügung gestellt.

heit wie infolge der experimentellen Infektion Antikörper gebildet werden, die mit gewissen Erythrocyten reagieren und die zum diagnostischen Nachweis der M.i. verwendet werden können. Der Zweck dieser Arbeit ist, den Erythrocytenantikörper bei M.i. zu charakterisieren und den diagnostischen Wert seines Nachweises mittels verschiedener Methoden, die in den vergangenen Jahren in verwirrend hoher Zahl empfohlen wurden, zu besprechen. Es wird schließlich ein neues Prinzip zum Nachweis des M.i. Antikörpers empfohlen, welches insofern zu beachten ist, als mit dessen Hilfe eine äußerst einfache und klare Resultate liefernde Absorptionsreaktion ausgearbeitet werden konnte.

1. Direkter Nachweis des M.i.-Antikörpers mittels Hämagglutination oder mittels Hämolyse

Paul und *Bunnel* (21) entdeckten, daß das Serum der an M.i. leidenden Menschen die gewaschenen Hammelerythrocyten meistens in höherem Titer agglutiniert als das Serum der unvorbehandelten gesunden oder dasjenige der mit Pferdeserum geimpften Menschen. Der Hämagglutinintiter der letzterwähnten Sera betrug in der Regel 1:4 bis 1:32, derjenige der M.i.-Sera 1:64 bis 1:mehreren Tausenden, wenn das Serum- und Hammelerythrocytengemisch nach 14–18stündiger Inkubation ohne Zentrifugieren abgelesen wurde. Ausnahmen in den oben erwähnten Titerwerten kamen nicht selten vor, obwohl die menschlichen Sera je nach Anamnese verschiedene Hammelhämagglutinine enthalten, die jeweils mit dem homologen, an der Oberfläche der Erythrocytenmembran eine bestimmte topographische Lagerung aufweisenden Antigen reagieren. *Nogalski* und *Lippelt* (20) fanden, daß 28% der Fälle aller Hepatitiden einen Heteroagglutinintiter zeigen, der, auf Grund des Paul-Bunnel-Testes allein beurteilt, zu Verwechslungen mit M.i. führen kann. Die als für M.i. positiv zu betrachtenden minimalen Titerwerte variieren von Laboratorium zu Laboratorium von 1:32 bis 1:128.

Die Hämolyse der Hammelblutkörperchen ist zum Nachweis der M.i.-Antikörper, wegen des äußerst niedrigen Titerwertes, vollkommen ungeeignet. *Tomcsik* und *Schwarzweiss* nahmen bereits 1947 an (36), «daß die Blutkörperchenagglutination und Hämolyse verursachenden Antikörper miteinander identisch sind und daß nur die Lagerung der betreffenden Antigene innerhalb der Erythrocyten es bedingt, ob die Agglutination oder aber die Hämolyse in den serologischen Reaktionen stärker zum Vorschein kommt». Wir halten diese Annahme, trotz anderer Auffassungen, die seither publiziert wurden (13), für gültig, doch würden wir es heute für richtiger finden, das nicht genügend definierte Wort «Lagerung» mit dem tieferen oder lockereren Einbau in die semi-

permeable Erythrocytenmembran zu ersetzen und gleichzeitig die eminente Rolle an der äußersten Oberfläche der Erythrocyten liegenden Substanzen zu betonen, die die Hämagglutination gewisser Erythrocyten durch bestimmte Antikörper sterisch hindern, wie es später besprochen wird.

An Stelle von Hammelerythrocyten wurden die gleichfalls empfindlichen Pferdeerythrocyten zur Diagnose der M.i.-Antikörper mittels direkter Hämagglutination empfohlen (u. a. 2, 9, 20). Der diagnostische Wert dieser Reaktion schien der Hammelerythrocytenagglutination nicht ebenbürtig zu sein.

Eine Sonderstellung nehmen die Rindererythrocyten bei der Heteroagglutination ein. Sie enthalten offenbar mehr «M-Antigen» als die anderen Erythrocyten, da sie mehr menschliche M.i.-Antikörper absorbieren und da sie durch M.i.-Antikörper in Anwesenheit von Komplement auch in höheren Verdünnungen hämolysiert werden als Hammelerythrocyten. Doch werden die Rindererythrocyten durch M.i.-Antikörper nicht oder höchstens in sehr niedrigem Titer agglutiniert. Diese Erkenntnisse stammen von *Bailey* und *Raffel* (1935 [1]). Die Rindererythrocyten enthalten kein Forssman-Antigen, ein Vorteil gegenüber den Hammelerythrocyten, weil die Forssman-Antikörper im Serum der gesunden Menschen häufig vorkommen und die diagnostische Ausbeutung der direkten Heteroagglutination erschweren. *Lippelt* und *Nogalski* (13) nahmen an, daß den Rindererythrocyten ein für die Heteroagglutination notwendiger Zellfaktor fehlt. Später erörtern wir ausführlich, weshalb diese Annahme nicht stichhaltig ist.

Die Hämolyse der Rindererythrocyten wurde von Zeit zu Zeit (2, 9, 12) zum direkten Nachweis der M.i.-Antikörper empfohlen. Da aber das Komplement mancher Meerschweinchen die Rindererythrocyten in einer Verdünnung von 1:20 bis 1:100 an und für sich auflöst, ist es kaum denkbar, daß eine solche Reaktion in der Praxis mit mühsamer Auswahl eines geeigneten Komplementes lohnen würde.

Aus den obigen Ausführungen ist zu entnehmen, daß sich zum Nachweis der M.i.-Antikörper bisher nur die Heteroagglutination der Hammelerythrocyten bewährte. Zur Durchführung dieser Probe wird das M.i.-Serum in Zweier-Potenz verdünnt und zu den verschiedenen Serumverdünnungen ana Volumen von gewaschenen Hammelerythrocyten in 1–2% Suspension zugegeben. Die eingetretene Hämagglutination wird meistens nach einer 14–18stündigen Inkubationszeit direkt abgelesen, aber sie kann, der Empfehlung von *Glanzmann* und *Ottensooser* folgend (10), auch ohne Inkubation nach Abzentrifugieren sofort abgelesen werden.

Lippelt und *Nogalski* (13) betrachten die Zentrifugiertechnik als un-

genau, und sie empfehlen diese höchstens als eine Vorprobe. *Tomcsik* und *Schwarzweiss* (36) verwendeten hingegen ausschließlich die Zentrifugiermethode zu ihren quantitativen Antigenstudien. Die parallele Einstellung der Inkubationstechnik und der Zentrifugiermethode in den letzten 12 Jahren hat uns überzeugt, daß die Hämagglutination der M.i.-Sera mit beiden Methoden übereinstimmende Resultate ergibt, doch ist die Ablesung mit der Zentrifugiertechnik klarer und die Fehler der Ablesung infolge nicht ganz gleichmäßigen Aufschüttelns des Agglutinates geringer.

2. Heteroagglutination mit absorbierten M.i.-Seren

Wir betrachten als Grundlage der «klassischen» Absorptionsmethode die Entdeckung von *Bailey* und *Raffel* (1), wonach die Rindererythrocyten, die kein Forssman-Antigen enthalten, die Hammelhämagglutinine aus M.i.-Serum in der Regel vollständig oder zumindest größtenteils absorbieren. Es ist selbstverständlich, daß, wenn das M.i.-Serum z. B. Forssman-Antikörper enthält, der häufig in den Seren gesunder Menschen vorkommt, die Rindererythrocyten selbst aus einem s. g. M.i.-Serum nicht alle Hämagglutinine absorbieren. Diese Schwierigkeit schalteten wir dadurch aus (36), daß wir die Sera zur Absorption, je nach ihrem Titer, derartig verdünnten, daß im Absorptionsgemisch knapp zwei hämagglutinierende Einheiten blieben. Mit dieser Modifikation erreichten wir fast mit allen typischen M.i.-Seren eine vollständige Absorption, wenn die Rindererythrocyten in 1% oder in höherer Konzentration verwendet wurden. Wir anerkennen aber, daß eine solche Methode in der Praxis zu umständlich ist und daß darauf um so mehr verzichtet werden kann, als bei der Rindererythrocytenabsorption der unverdünnten M.i.-Sera ein auf mehrere Stufen sich erstreckender Titerrückgang erreicht werden kann.

Davidsohn (8) erkannte, daß Meerschweinchennierensuspension, im Gegensatz zu Rindererythrocyten, die M.i.-Antikörper nicht absorbiert, demgegenüber absorbiert sie in der Regel die «Normalagglutinine». Er hat eine Differentialabsorptionsmethode zur serologischen Diagnose der M.i. empfohlen, die auch als Differentialtest bezeichnet wurde. Da diese Methode, bei der zur Absorption einerseits Rindererythrocyten, anderseits Meerschweinchenniere verwendet werden, in den letzten zwanzig Jahren sowohl in den USA wie in Westeuropa ohne wesentlichere Variationen zur serologischen Diagnose der M.i. verwendet wurde, bezeichnen wir sie in dieser Arbeit als die «klassische Absorptionsmethode», um sie gegenüber mehreren in der letzten Zeit entwickelten «Differentialtesten» unterscheiden zu können.

Die Grundlagen der klassischen Absorptionsmethode wurden sowohl durch die medizinisch-diagnostischen Laboratorien der erwähnten Länder, wie in theoretischen Arbeiten bestätigt. *Stuart* u. Mitarb. (34) wiesen darauf hin, daß das M-Antigen der Hammel- und der Rindererythrocyten thermostabil ist und daß dieses aus den Erythrocyten durch Alkohol nicht extrahiert werden kann. Zur Absorption können somit aufgekochte Suspensionen der Rindererythrocyten und der Meerschweinchenniere verwendet werden, die im Eisschrank längere Zeit haltbar sind.

Über die Resultate der klassischen Absorptionsmethode in der Schweiz berichteten *Tomcsik* und *Schwarzweiss* (39) ausführlich, und zwar sowohl bei M.i.-Seren wie bei Serumkrankheitsseren und Normalseren. Vollständigkeitshalber muß doch darauf hingewiesen werden, daß vereinzelte Autoren die Resultate der klassischen Absorptionsmethode nicht bestätigen konnten. *Blumenthal* u. Mitarb. (4) erhielten eine gute, diagnostisch verwertbare Absorption der Normalantikörper mit präzipitiertem Pferdeserum (Tornack-Antigen). Dieser Befund wurde von den meisten anderen Autoren nicht bestätigt. Demgegenüber teilten *Blumenthal* u. Mitarb. im Gegensatz zur ganzen Weltliteratur mit, daß Rinderblut und Meerschweinchenniere «gleichermaßen beide Antikörpergruppen absorbieren».

Wir erhielten während der letzten 12 Jahre in einigen Tausenden von Absorptionsreaktionen klare Resultate. Zahlenmäßig zitieren wir hier die Resultate der letzten 10 Monate, die die Heteroagglutination (mit nativen Hammelerythrocyten) nach der klassischen Absorptionsmethode mit 167 klinisch M.i.-verdächtigen Seren zusammenfassen. Wir erhielten 47,5% deutlich positive und 47,5% deutlich negative Resultate betreffend M.i. In 5% konnten wir die Absorptionsreaktion nicht interpretieren, obwohl diese mit der umständlicheren Technik eingestellt wurde, indem das Serum zur Absorption derartig verdünnt wurde, daß im Absorptionsgemisch nur 2 hämagglutinierende Einheiten vorhanden waren. Dieser Prozentsatz ist aber im Vergleich zu den Fehlerquellen, die der direkten Hämagglutination obliegen, gering, wie aus Tab. 1 zu entnehmen ist.

Die Resultate der Zentrifugiermethode sind nicht schlechter als diejenigen der sorgfältig durchgeführten Paul-Bunnel-Reaktion, soweit es auf Grund der Literatur beurteilt werden kann. Immerhin ergeben nur 76% der auf Grund der Absorptionsreaktionen eindeutig positiven M.i.-Sera eine positive Reaktion, doch kamen 5% unspezifische Reaktionen vor. Die Resultate mit der originalen Paul-Bunnel-Reaktion waren ausgesprochen schlecht. Gegenüber 82% Empfindlichkeit stand 39% Unspezifität. Diese schlechten Resultate werden an erster Stelle darauf zu-

Tabelle 1

Agglutination der nativen Hammelerythrocyten

Typ des Serums*	Total Sera	Anzahl Sera bei einem Agglutinintiter** von									
		< 8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
		(reziproker Titerwert)									
		nach der Originalmethode von Paul und Bunnel									
M	79	1	1	2	10	13	17	12	7	16	
M?	9		3	1	2	1	1	1			
nicht M	77		13	14	19	20	6	2	2		
		Anzahl Sera bei einem Agglutinintiter** von									
		< 6	6	12	24	48	96	192	384	768	1536
		(reziproker Titerwert)									
		mit der Zentrifugiermethode									
M	79			9	10	19	13	13	5	5	5
M?	9			1	6	2					
nicht M	79		14	28	33	3	1				

* nach der klassischen Absorptionsmethode
** auf das Endvolumen berechnet

rückgeführt, daß die Ablesung dieser Probe in unserer Untersuchungsabteilung durch wechselnde Assistenten vorgenommen wurde, währenddessen die Titerwerte der Zentrifugiermethode immer durch dieselbe Person (der Unterzeichnete) abgelesen wurde. Sorgfältige Vergleiche zwischen der Original- und der Zentrifugiermethode ergaben keine Unterschiede. Unserer Ansicht nach ist die Originalmethode von Paul-Bunnel zur M.i.-Diagnose in einer Untersuchungsabteilung ungeeignet, weil 1. individuelle Unterschiede in der Ablesung (Tendenz zu einer zu empfindlichen Ablesung) eine beträchtliche Fehlerquelle verursachen, 2. die Unterschiede in den Hammelerythrocyten an verschiedenen Versuchstagen auch eine Fehlerquelle bilden können, 3. mit einer sorgfältigen Standardisierung der Ablesungen und mit sorgfältiger Auswahl der Hammelerythrocyten die nicht-spezifischen Reaktionen doch nicht eliminiert werden.

Wegen der oben erwähnten Gesichtspunkte kann eine serologische Diagnose der M.i. nur mit einer Heteroagglutination nach Absorption gestellt werden. Wir konnten selbst bei dieser Reaktion die Zentrifugiertechnik mit klarem Resultat verwenden.

3. Isolierung einzelner Heteroantigene aus den Erythrocytenmembranen

Die nach der Hämolyse der Erythrocyten gewonnenen Membranen oder Stromata bestehen nach der allgemeinen Auffassung aus thermo-

Ad Tabelle 2

Extraktion der S- und M-Antigene aus Rindererythrocytenstroma nach *Tomcsik* und *Schwarzweiss*

Fraktion	Extraktionsmittel	°C	%	Absorptionsaktivität*	
				M-Serum	S-Serum
1	Aceton	20	8,6	0	0
2	Äthanol 100%	20	12,6	250	16 000
3	Äthanol 100%	100	0,7	16 000	*250 000*
4	Äthanol 80%	100	6,1	*1 000 000*	16 000

* die höchste Verdünnung der Fraktionen (auf Trockensubstanz berechnet), die 2 Agglutinineinheiten absorbiert.

labilen Eiweißkörpern, deren prosthetische Gruppen in einer nicht näher bekannten Molekularanordnung verschiedene thermolabile Lipoide, Mucopolysaccharide und Polypeptide sind. Die thermolabilen Proteine entsprechen den speciesspezifischen und gewissen gruppenspezifischen Antigenen (37). Sie werden durch Trypsin, Pepsin und durch die meisten organischen Lösungsmittel inaktiviert (37). Sie können ohne Inaktivierung durch vorsichtige $NaHCO_3$-Extraktion aus den Membranen in Lösung gebracht werden, ohne ihre serologisch aktiven prosthetischen Gruppen zu verlieren. Demgegenüber können die thermostabilen prosthetischen Gruppen durch entsprechende stufenweise erfolgende Extraktionen voneinander getrennt werden, wie es Tab. 2 zeigt.

Die experimentellen Unterlagen, die zu dieser kurzen tabellarischen Zusammenfassung berechtigen, wurden von *Tomcsik* und *Schwarzweiss* (24–26, 38) ausführlich beschrieben.

Das Forssman-Antigen konnten wir aus acetonbehandelten Hammelstromata sowie aus Meerschweinchenniere, Pferdeniere und Pferdeherz (*Tomcsik* und *Fischer*, 1946) in hohem Reinheitsgrad herstellen. Dieses Antigen ist aus den Forssman-negativen Rindererythrocytenmembranen selbstverständlich nicht zu extrahieren. Doch halten es *Lippelt* und *Nogalski* (13, S. 189) noch 1953 für fraglich, ob überhaupt von einem «S-Typ» gesprochen werden kann. Unserer Auffassung nach enthält die Meerschweinchenniere außer größtenteils unbekannten Proteinantigenen F- und S-Antigen. Die bekannten thermostabilen Antigene der Hammelerythrocyten sind F, S und M und diejenigen der Rindererythrocyten S und M. Wir hielten den Reinheitsgrad der aus Erythrocytenmembranen isolierten F-, S- und M-Antigene für ungenügend, um bindende Schlußfolgerungen über ihre chemische Natur ziehen zu können. Immerhin vermuteten wir auf Grund unserer chemischen Analysen in den hochaktiven M-Antigen-Extrakten Mucopolysaccharide. *Markowitz* und

Simmonds (14) bestätigten vollauf, daß mit unserer Extraktionsmethode die S- und M-Antigene in hohem Aktivitätsgrad und voneinander größtenteils separiert, hergestellt werden konnten. Ihr M-Antigen zeigte eine noch höhere serologische Aktivität als das unsere (26); in elektrophoretischen Untersuchungen schien es aber nicht einheitlich zu sein. Offenbar haben sie unsere reservierte Meinung über die Berechtigung chemischer Schlußfolgerungen nicht bemerkt, und sie diskutieren (14) seitenlang die Diskrepanz ihrer Analysen gegenüber unseren Befunden, da sie das gereinigte M-Antigen als Polypeptid betrachteten und mit Trypsin und Pepsin verdauen konnten. Seither haben mehrere Arbeiten (u. a. 32 und 35) festgestellt, daß das M-Antigen der Rindererythrocyten entsprechend unseren früheren Befunden (37) weder mit Trypsin noch mit Pepsin zu verdauen ist. *Springer* und *Rapaport* (32) kamen 1957 zur Schlußfolgerung, daß Kohlenhydrate in der Spezifität der M-Rezeptoren eine Rolle zu spielen vermögen.

Da die Arbeiten von *Simmonds* und *Markowitz* (27) sowie von *Markowitz* und *Simmonds* (14) eine Anzahl ungenauer und unverständlicher Bemerkungen enthalten, die den Leser der einschlägigen Literatur irreführen können, sollen einige davon hier kurz angeführt werden. Sie behaupten (27), daß sie ihre Arbeit «simultan» mit *Tomcsik* und *Schwarzweiss* durchführten. Die letzteren publizierten die Isolierung des M-Antigens (25) 1948 in den USA; *Simmonds* und *Markowitz* (27) schickten ihre erste Arbeit 1952 zur Publikation ein. Sie schreiben, daß *Stuart* u. Mitarb. ein thermostabiles Antigen (B.T.) aus Rindererythrocyten extrahierten. *Stuart* u. Mitarb. (34) teilen mit, daß sie das thermostabile Antigen aus Rindererythrocyten nicht extrahieren konnten. Sie behaupteten (14), daß *Tomcsik* und *Schwarzweiss* mit heißer alkoholischer Extraktion sowohl aus Hammel- wie aus Rindererythrocyten-Stroma das M-Antigen isolieren konnten. Wir (25) beschrieben die Isolierung des M-Antigen aus Rinderstroma und gaben an, daß das gleiche Verfahren das M-Antigen im Hammelstroma größtenteils zerstört. Sie behaupten, daß wir die Extraktionszeit nicht publiziert haben, und dafür zitieren sie an Stelle von (25) eine nicht existierende Arbeit usw.

4. *Verhalten des «M-Antigens» gegenüber proteolytischen Enzymen*

Es ist evident, daß jedwede proteolytische Behandlung der Erythrocyten, wobei eine Hämolyse vermieden werden soll, nur mit entsprechend verdünnten Enzymen und nur während einer kurzen Zeit durchgeführt werden darf. Eine solche Behandlung der Erythrocyten leistete in der Praxis sehr große Dienste zum Nachweis der «inkompletten» Antikörper und die diesbezügliche Literatur ist dementsprechend eine sehr umfangreiche. Eine vorsichtige enzymatische Behandlung der Erythrocyten kann selbstverständlich nur auf die an der äußersten Oberfläche der Erythrocyten liegenden Substanzen wirken. Nichtsdestoweniger gelang es auch mit dieser Methode, die enzymatische Inaktivierung mancher oberflächlich gelagerter Antigensubstanzen nachzuweisen. Eine bindende Schlußfolgerung, ob irgendeine Antigensubstanz gegenüber einem ge-

wissen proteolytischen Enzym empfindlich ist oder nicht, läßt sich doch nur durch eine intensive Behandlung der isolierten Erythrocytenmembran (des Stromas) erreichen, wobei die Konzentration des Enzyms und die Zeitdauer der Einwirkung beliebig erhöht werden kann.

a) Durchgreifende enzymatische Behandlung der Antigene

Tomcsik und *Schwarzweiss* (1948) waren die ersten, die die Einwirkung von proteolytischen Enzymen auf die Antigensubstanzen im Stroma der Hammel- bzw. der Rindererythrocyten untersuchten (37). Sie führten die enzymatische Behandlung des Stromas mit Pepsin bei pH 3–4, mit Trypsin bei pH 7,8–8 während 20 Stunden bei 37° durch und konnten feststellen, daß diejenigen Antigensubstanzen des Stromas, die mit den Forssman- und Serum-Krankheits- bzw. mit M.i.-Antikörpern reagierten, kaum in ihrer serologischen Aktivität beeinflußt wurden. Demgegenüber wurde die serologische Aktivität des Antigens, welches mit dem isogenetischen Antikörper (Kaninchenimmunserum nach Absorption mit Meerschweinchenniere) reagierte, durch Behandlung mit Trypsin und Pepsin, durch Erhitzen (70° C) sowie durch Behandlung mit Äthylpropyl-isobutylalkohol, Pyridin, Formamid, Phenol, Essigsäureanhydrid vollkommen aufgehoben. Dieses Antigen konnte erst durch vorsichtige Extraktion aus dem Stroma in Lösung gebracht werden, es reagierte aber selbst nach einer solchen Extraktion außer mit dem isogenetischen auch mit den M-, S- und F-Antikörpern. Die Aktivität der auf verschiedene Weise behandelten Erythrocytenmembranen wurde durch quantitative Absorptionsversuche gegenüber zwei agglutinierenden Einheiten der verschiedenen Antikörper geprüft. Aus diesen Versuchen kann abgeleitet werden, daß die M-, S- und F-Antigene nicht nur thermostabil, sondern auch resistent gegenüber Trypsin und Pepsin sind. Sie sind wahrscheinlich als prosthetische Gruppen an ein speciesspezifisches thermolabiles und mit proteolytischen Enzymen inaktivierbares Protein der Zellmembran gebunden.

Diese Versuche wurden betreffend des M-Antigens durch *Markowitz* und *Simmonds* (1953) mit der gleichen Technik wiederholt (14). Ihre Resultate waren aber ganz andere, da sie sowohl das M-Antigen im Stroma wie das aus dem Stroma der Rindererythrocyten nach dem Verfahren von *Tomcsik* und *Schwarzweiss* isolierte und gereinigte M-Antigen mit Pepsin und Trypsin voll verdauen konnten. Da wir diese abweichenden Resultate nicht erklären konnten, haben wir (*Tomcsik* und *Baumann-Grace* [35]) die Versuche mit proteolytischen Enzymen neuestens sowohl mit Hammel- und Rinderstroma wie mit dem aus dem Rinderstroma isolierten, gereinigten M-Antigen wiederholt, wobei wir bei der enzyma-

tischen Behandlung eine etwas erhöhte Temperatur und Zeitdauer verwendeten, um auch diesbezüglich die Versuchsbedingungen von *Markowitz* und *Simmonds* vollkommen einzuhalten. Nach Trypsinbehandlung zeigten alle Antigene eine kaum verminderte hohe Absorptionsfähigkeit gegenüber den M.i.-Antikörpern. Anders verhielt sich das Papain. Entsprechend der Beobachtung von *Wöllner* (44) inaktivierte das Papain das M-Antigen im Stroma der Hammelerythrocyten. Demgegenüber wurde weder das M-Antigen des Rinderstromas noch das gereinigte, aus Rinderstroma gewonnene M-Antigen durch Papain inaktiviert. Wir halten diese Resultate für besonders signifikant, da das gleiche Enzym in vollkommen identisch gehaltenen Versuchen auf das Hammelstroma ganz anders wirkte als auf das Rinderstroma. Diese Resultate sind überraschend, da unseres Wissens noch nie beobachtet wurde, daß ein Antigen, welches dieselbe serologische Reaktion gibt, in verschiedene Erythrocyten eingebaut, ein anderes Verhalten gegenüber einem gewissen proteolytischen Enzym aufweist. Die verschiedene chemische Beschaffenheit des s. g. M-Antigens in Hammelerythrocyten einerseits, in Rindererythrocyten anderseits läßt sich auf Grund der Beobachtungen von *Schwarzweiss* und *Tomcsik* (25) ableiten, die mit ihrem Verfahren das M-Antigen aus Rinderstroma mit sehr hoher serologischer Aktivität isolieren konnten, während das gleiche Verfahren das M-Antigen des Hammelstromas größtenteils inaktivierte.

b) Die Wirkung proteolytischer Enzyme auf die äußerste Oberfläche der Erythrocyten

Pickles (22) und *Morton* und *Pickles* (18) entdeckten ein für die Immunohämatologie bedeutungsvolles Phänomen, wonach die durch inkomplette Antikörper sensibilisierten menschlichen Erythrocyten agglutiniert wurden, wenn sie nachträglich mit dem Filtrat von V. cholerae-Kulturen oder mit Trypsin behandelt wurden. *Quilligan* (1948, zit. von *Wheeler* u. Mitarb. [42]) beobachtete, daß dieselbe Wirkung auch mit anderen proteolytischen Fermenten, wie Pepsin, Papain und Erepsin, hervorzurufen ist. Die von *Morton* und *Pickles* empfohlene Methode (1. Sensibilisierung mit Antikörpern, 2. Behandlung mit proteolytischen Enzymen) wurde unter andern in den später zu besprechenden Arbeiten von *Gleeson-White* u. Mitarb. (11) und von *Eyquem* u. Mitarb. (9) verwendet. Erst *Wheeler* u. Mitarb. (42) führten die heute verbreitete Methodik ein, indem sie die Erythrocyten vorsichtig mit ca. 1:1000 oder höher verdünntem Trypsin bzw. mit anderen proteolytischen Enzymen vorbehandelten und die an der Oberfläche der Erythrocyten enzymatisch veränderte Suspension nach einmaligem Waschen mit Antikörpern agglu-

tinierten. Es ist verständlich, aber nicht richtig, daß in einigen späteren Arbeiten jeweils, wenn die Hämagglutination mit enzymatisch vorbehandelten Erythrocyten empfindlicher ausfiel, die Beteiligung von inkompletten Antikörpern angenommen wurde. *Wheeler* u. Mitarb. wiesen nach (42), daß außer Trypsin auch Chymotrypsin, Bromelin und einem aus Russel-Vipern gewonnenen proteolytischen Enzym die Oberfläche der vorbehandelten Erythrocyten in einer Weise geändert hat, daß mehr serologisch aktive Antigengruppen freigelegt wurden.

Die erste Arbeit, die manche Rätsel über die schlechte Agglutinabilität der Rindererythrocyten sowohl durch den M-Antikörper wie durch andere Immunantikörper lösen konnte, war diejenige von *Gleeson-White* u. Mitarb. (11). Eine früher unbekannte Variation der Oberfläche dieser Erythrocyten wurde vermutet. Der Albumintest förderte diese Agglutination nicht. Der einfache «Coombs-Test» war auch ungenügend, demgegenüber führte der Aufbau von mehrfachen γ-Globulin- und Anti-γ-Globulin-Brücken auf der Oberfläche der mit M-Antikörpern sensibilisierten Rindererythrocyten zum gewünschten Resultat. Sie erhielten aber auch mit einer weitaus einfacheren Methode eine gute Agglutination der Rindererythrocyten mit M.i.-Antikörpern, indem sie die Trypsinmethode von *Morton* und *Pickles* verwendeten. *Coombs* (7) erklärt diese Beobachtung teilweise mit der enzymatischen Verdauung gewisser Substanzen an der Oberfläche der Rindererythrocyten, teilweise mit einer tieferen Lage des M-Antigens. Wir verstehen aber nicht, weshalb *Coombs* (7) postulierte, daß die Moleküle der M.i.-Antikörper nicht nur bivalent, sondern auch klein sein müssen. Die Erklärung wäre viel plausibler, daß das M-Antigen an der Oberfläche der Rindererythrocyten mit einer mächtigeren, lockeren Proteinschicht überdeckt ist, während es bei den Hammelerythrocyten an der Oberfläche liegt. Deshalb geben die trypsinbehandelten Hammelerythrocyten keinen, die gleicherweise behandelten Rindererythrocyten einen weitaus höheren Hämagglutinationstiter mit M-Serum als die nativen Erythrocyten. *Eyquem* u. Mitarb. (9) konnten ebenfalls mit Trypsin die Rindererythrocyten betreffend M.i.-Antikörperagglutination aktivieren und ohne jedwede andere Grundlage nahmen sie an, daß diese Antikörper «inkomplette» sind.

Die Enzymstudien von *Wöllner* (44–48) beschränkten sich auf papainisierte Hammelerythrocyten. Er war der erste, der die Papaininaktivierung des M-Antigens in Hammelerythrocyten beobachtet hat. Seine Befunde wurden bestätigt und ergänzt durch *Springer* und *Rapaport* (32). Diese Autoren stellten fest, daß die Hammelerythrocyten durch alle untersuchten proteolytischen Enzyme pflanzlicher Herkunft derartig beeinflußt werden, daß sie von dem M-Antikörper in weitaus niedrigerem

Titer agglutiniert werden, während die Behandlung dieser Erythrocyten mit proteolytischen Enzymen von tierischer Herkunft zu keinerlei Veränderung des M-Titers führt. Sie werfen auch eine interessante Idee zur Erklärung des Wirkungsmechanismus der pflanzlichen proteolytischen Enzyme auf, wonach diese die M-Substanz nicht inaktivieren, sondern in Lösung bringen sollen. In der Tat konnten sie eine gewisse serologische Aktivität in der nach der enzymatischen Behandlung gewonnenen überstehenden Flüssigkeit nachweisen. Doch soll darauf hingewiesen werden, daß laut der früher besprochenen Arbeit von *Tomcsik* und *Baumann-Grace* (35) mit der durchgreifenden Papainbehandlung der Hammelstromata ein beträchtlicher Verlust der serologischen Aktivität nachgewiesen werden konnte, obwohl entsprechend dieser Versuchsanordnung die überstehende Flüssigkeit der mit proteolytischen Enzymen vorbehandelten Erythrocytenmembranen zur Absorption auch mitverwendet wurde. Da in den früher zitierten Arbeiten die Wirkung des Papains auf die M-Agglutinabilität der Rindererythrocyten nicht untersucht wurde, haben *Tomcsik* und *Baumann-Grace* (1959) mit kristallisierten Präparaten von Papain und Trypsin in der gleichen Versuchsanordnung sowohl Hammel- wie Rindererythrocyten behandelt und ihre Agglutinabilität mit M.i.-Antikörpern geprüft. Ihre Resultate sind summarisch in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Verhalten des «M-Antigens» bei der enzymatischen Behandlung der äußersten Erythrocytenoberfläche

«M-Antigen» der	Trypsin	Papain
Hammelerythrocyten	–	Verdauung*
Rindererythrocyten	Aktivierung**	Aktivierung**

– keine Änderung der Aktivität infolge Enzymbehandlung
* partielle Verdauung, mit Herabsetzung des Hämagglutinintiters
** sehr starke Aktivierung betreffend Hämagglutination

Die *Topographie* der verschiedenen in die Membran eingebauten Antigene oder Haptene ist weder bei den menschlichen noch bei den Hammel- und Rindererythrocyten genau bekannt. Die Idee über einen tieferen Einbau oder aber einer Exposition gewisser Antigenmicellen der Erythrocytenmembranen kam uns 1947 durch die extremen Unterschiede der Quotienten Hämolysin/Hämagglutinin-Titer. Bei dem M.i.-Antikörper beträgt dieser Quotient 1 oder weniger für die Hammel- und 100 oder mehr für die Rindererythrocyten. Wenn bei der Agglutinationsreaktion diejenigen Antigene involviert sind, die an der äußersten Oberfläche der Zellen liegen, ist es evident, daß das M-Antigen in der

Membran der Rindererythrocyten tiefer liegen muß als in den Hammelerythrocyten (36). Aus der Verschiedenheit des Hämolysintiters kann weiterhin gefolgert werden, daß das M-Antigen in die Erythrocytenmembran der Rinderblutkörperchen nicht nur tiefer, sondern auch fester eingebaut ist, während das M-Antigen der Hammelerythrocyten mit der semipermeablen Membran nur in lockerer Verbindung steht. Seit der Entdeckung von *Morton* und *Pickles* (18), wonach die Erythrocyten mit proteolytischen Fermenten derartig vorsichtig behandelt werden können, daß sie keine Hämolyse erleiden, wissen wir, daß die Erythrocyten mit einer mehr oder weniger lockeren Proteinhülle umgeben sind, die je nach Erythrocytenart verschiedene Mächtigkeit aufweist. Die proteolytischen Enzyme entfernen diese lockere Proteinhülle, setzen gewisse enzymresistente Antigenmicellen frei, sie erreichen aber die inneren Schichten der semipermablen Membran nicht. Unserer Ansicht nach ist die lockere Proteinhülle am mächtigsten an den Rindererythrocyten; um so interessanter ist es, daß die großen Antikörpermoleküle diese Schicht passieren können, da die mit proteolytischen Enzymen nicht behandelten Rindererythrocyten eine beträchtliche Menge von M.i.-Antikörpern binden. Unsere diesbezüglichen Ansichten scheinen im Vergleich einschlägiger Arbeiten der Literatur (42, 43, 6, 11, 7, 19, 35) allzu apodiktisch zu sein. Doch können wir aus den wichtigsten Arbeiten immer deutlicher eine ähnliche Hypothese entnehmen. Anfänglich wurde zur Erklärung der Wirkungsweise der proteolytischen Enzyme auf die Erythrocytengrenzfläche nur über die Freisetzung von mehreren Antigen«loci» gesprochen (42). In späteren Arbeiten wurde immer deutlicher die Verdauung einer peripheren Proteinschichte angenommen, die die einzelnen Antigene mehr oder weniger deckt und die Hämagglutination sterisch hindert. Ein Nicht-Rhesusfachmann könnte sogar die Frage stellen, ob es richtig ist, in manchen Fällen über «inkomplette» Antikörper zu reden, allein auf Grund der Beobachtung, daß die mit proteolytischen Enzymen behandelten Erythrocyten durch einen gewissen Antikörper agglutiniert bzw. besser agglutiniert werden. Wir bezweifeln die wertvollen Informationen der Literatur über inkomplette Antikörper nicht, doch glauben wir, daß in manchen Fällen, schematisch und unberechtigt, inkomplette Antikörper postuliert wurden, weil die Topographie der Antigene allzu wenig berücksichtigt wurde.

5. Wöllner-Test zur serologischen Diagnose der M.i. mittels papainisierter Hammelerythrocyten

Wöllner hat, nachdem er die Inaktivierung des M-Antigens in papainisierten Hammelerythrocyten entdeckte, vorausgesehen, daß die Agglu-

tination der nach *Morton* und *Pickles* behandelten Erythrocyten zur serologischen Diagnose der M.i. zugezogen werden kann. Er arbeitete ausschließlich mit Hammelerythrocyten, deren «Proteinhülle» mit vorsichtiger Papainbehandlung entfernt wurde. In keiner seiner Arbeiten (44–48) erwähnt er den Mechanismus der Papainwirkung bzw. Fragen über Topographie der Antigene. Er hat seine neue diagnostische Methode stufenweise ausgebaut, deshalb besprechen wir diese – der leichteren Übersicht halber – als Wöllner I und Wöllner II.

Wöllner I. Da das M-Antigen der Hammelerythrocyten mit Papain inaktiviert wird, hat er bei der Hämagglutination der papainisierten Hammelerythrocyten ein gegensätzliches Verhalten der M.i. und der «Normalsera» beobachtet. Die Mehrzahl der M.i.-Sera zeigte einen niedrigeren Hämagglutinintiter mit papainisierten als mit nativen Hammelerythrocyten. Die Normalsera reagierten, mit dieser Technik geprüft, gleichsinnig; bei allen konnte eine Titererhöhung konstatiert werden.

Die konstante Titererhöhung der «Normalsera» ist unserer Ansicht nach leicht zu erklären. Die F- und S-Antigene sind in die Membran der Hammelerythrocyten tiefer eingebaut (hoher Quotient des Hämolysin/Agglutinin-Titers). Wenn somit nach unseren Beobachtungen die «Proteinhülle», die sie bedeckt, entweder mit Papain oder mit Trypsin (35) entfernt wird und die F- und S-Antigene «demaskiert» werden, muß die Hämagglutination mit Normalseren, die am häufigsten F- und S-Antikörper enthalten, eine Titererhöhung ergeben. Trypsin inaktiviert das M-Antigen nicht (35); die Titergleichheit mit nativen Erythrocyten beweist in diesem Falle, daß das M-Antigen auch in nativen Hammelerythrocyten an der Grenzfläche liegt. Wenn nun Papain das M-Antigen inaktiviert, sollte unbedingt eine Titerabnahme mit papainisierten Erythrocyten entstehen, vorausgesetzt, daß das M.i.-Serum nur M.i.-Antikörper enthält. Das ist aber eben nicht der Fall. Wenn ein Mensch «normale» Hämagglutinine enthält, werden nach einer M.i.-Infektion M.i.-Antikörper zusätzlich gebildet. Die Papaininaktivierung der M-Antigene kann somit durch Papainaktivierung der F- und S-Antigene wettgemacht werden, und an Stelle einer erwarteten Titerabnahme kann sogar eine Titerzunahme beobachtet werden.

Wöllner studierte die diagnostische Bedeutung der direkten Differentialagglutination in zwei Arbeiten (44, 45) äußerst sorgfältig. Er hat sogar das Blut der zur Verfügung stehenden Hammel in Vorversuchen ausgewählt. Trotz des häufigen unregelmäßigen Verhaltens der M.i.-Sera stellt er fest (44), daß die Unterscheidung der M.i.-Sera und der nicht M.i.-Sera mit dieser Methode «vielfach auch ohne Zuhilfenahme der Absorption möglich ist». Aus seinen Arbeiten kommen wir vielmehr zur Schlußfolgerung, daß die direkte Differentialhämagglutination einerseits mit nativen, andererseits mit papainisierten Hammelerythrocyten viel weniger zur serologischen Diagnose der M.i. geeignet ist als die oben besprochene klassische Absorptionsreaktion.

Wöllner II. In seinen späteren Arbeiten (46–48) erkannte *Wöllner*, daß die serologische Diagnose der M.i.-Antikörper selbst bei Verwendung

einer «Differentialagglutination» erst nach Absorption der Sera möglich ist. Zur Absorption verwendete er an Stelle der Meerschweinchenniere eine sehr dichte Suspension von papainisierten Hammelerythrocyten. Theoretisch ist anzunehmen, daß, wenn die Papainbehandlung das M-Antigen der Hammelerythrocyten größtenteils zerstört bzw. in Lösung bringt, die F- und S-Antigene der Erythrocyten aber intakt läßt, mit papainisierten Erythrocyten ein ähnlicher Absorptionseffekt zu erreichen ist wie mit Meerschweinchenniere. Die Absorption nach *Wöllner* ist somit wohlbegründet, doch halten wir es für übertrieben, diese Prozedur allein als «Isolierung des M.i.-Antikörpers» zu bezeichnen (46). Nachdem wir die Grundprinzipien des Wöllner II-Testes bestätigen konnten, anerkennen wir, daß seine Absorptionsmethode gekoppelt mit Differentialagglutination zu einer gewissen Verfeinerung der serologischen Diagnose der M.i. führen kann, doch können wir aus den bisherigen Arbeiten (46, 48) nicht mit Sicherheit entnehmen, daß das Ersetzen einer geeigneten Meerschweinchennierensuspension bei der Absorption mit einer zweifellos mehr technische Komplikationen bedeutenden, papainisierten Hammelerythrocytensuspension signifikante Vorteile bedeutet. Wir halten die technische Einstellung des Wöllner II-Testes für komplizierter als diejenige der klassischen Absorptionsreaktion. Es ist zweifelhaft, ob kleinere medizinisch-diagnostische Laboratorien, die bisher nicht einmal die klassische Absorptionsreaktion eingeführt haben, den Wöllner II-Test einführen könnten. *Muschel* und *Piper* (19) fanden in einer vor kurzem publizierten Arbeit eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem Wöllner II-Test und der klassischen Absorptionsreaktion, sie haben aber sehr wenige M.i. und andere Sera untersucht.

Wöllner (46) bezweifelt anscheinend die Existenz des von *Tomcsik* und *Schwarzweiss* (37) beschriebenen speziesspezifischen Proteins, welches durch Trypsin und Pepsin zu inaktivieren ist. Er schreibt: «Aus unserer Versuchsanordnung ergab sich kein Anhalt dafür, daß außer dem M-Antigen durch die Fermentbehandlung noch ein weiteres, etwa das dem homologen artspezifischen Antikörper entsprechende Antigen des Hammelblutes inaktiviert würde.» Da die Aktivität der proteolytischen Enzyme bei einer derartigen Behandlung der Erythrocyten, wo keine Hämolyse entsteht, sich nur auf die äußerste Grenzfläche erstreckt, ist es nur selbstverständlich, daß *Wöllner* die thermolabilen, gegenüber proteolytischen Enzymen empfindlichen Proteine der semipermeablen Membran nicht erfassen konnte.

6. Unsere Reaktion zur serologischen Diagnose der M.i. mittels trypsinbehandelter Rindererythrocyten

Die Ursachen, weshalb wir die Eignung der Rindererythrocyten zur Ausarbeitung einer einfachen M.i.-diagnostischen Reaktion an erster Stelle studierten, waren die folgenden: a) Die Rindererythrocyten enthalten kein Forssman-Antigen, somit bestand die Hoffnung, daß die

«normalen» Sera selbst die mit proteolytischen Enzymen vorbehandelten Blutzellen seltener agglutinieren. b) Weder Papain noch Trypsin inaktivieren das M-Antigen der Rindererythrocyten, die nach einer entsprechenden enzymatischen Behandlung durch M.i.-Sera in gleichem oder in höherem Titer agglutiniert werden als die nativen Hammelerythrocyten. c) Die Hämagglutination der mit proteolytischen Enzymen vorbehandelten Rindererythrocyten erfolgt sehr regelmäßig, und die Ablesung des Titers mittels der Zentrifugiertechnik ist sehr scharf reproduzierbar.

Zu unserer systematischen Untersuchung wählten wir an Stelle von Papain- eine Trypsinbehandlung der Rindererythrocyten, weil die Trypsinpräparate (Siegfried-Zofingen, Difco usw.) a) leichter zu erhalten und leichter aufzulösen sind, b) in höheren Verdünnungen aktiv sind, c) keine Spur von Hämolyse hervorrufen.

Der Aktivitätsgrad des kristallinischen, reinen Trypsins und des Papains wurde in unserer früheren Arbeit (35) besprochen. Die brauchbaren rohen Trypsinpräparate waren gleich aktiv in einer 1:1000 bis 1:30 000 Verdünnung, wenn 1,9 ml von dieser 0,1 ml Sediment 3mal gewaschener Rindererythrocyten zugegeben und das Gemisch 30 Minuten bei 37° C gehalten wurde. Die «Proteinhülle» der Erythrocyten wurde durch diese Behandlung vollständig entfernt, und die so behandelten Erythrocyten wurden nach einmaligem Waschen zur Hämagglutination verwendet.

Anfangs hofften wir, daß die Titerunterschiede, selbst bei der direkten Hämagglutination, zwischen den M.i.-Seren einerseits und den nicht M.i.-Seren andererseits bei Verwendung von trypsinisierten Rindererythrocyten deutlich größer werden als bei Verwendung der nativen Hammelerythrocyten (Paul-Bunnel-Reaktion). In dieser Hoffnung haben wir uns aber getäuscht. Die trypsinisierten Rindererythrocyten wurden nämlich, obwohl sie kein Forssman-Antigen enthalten, von den meisten «Normalseren» unerwartet nicht nur in niedrigen, sondern auch in mittelhohen Titerwerten agglutiniert. Diese Beobachtung wies darauf hin, daß, im Gegensatz zur allgemeinen Auffassung in der einschlägigen Literatur, doch nicht die Forssman-Antikörper die in menschlichen Seren am häufigsten vorkommenden Heteroagglutinine sind. Wegen der prinzipiellen Bedeutung dieser Beobachtung wird diese Frage in unserem Institut ausführlich bearbeitet. Die ganz typischen M.i.-Sera agglutinierten die trypsinisierten Rindererythrocyten in weitaus höherem Titer als die «Normalsera». Selbst die M.i.-Sera mit niedrigen Titerwerten konnten innerhalb eines Versuchstages von den «Normalseren» unterschieden werden, doch wenn die Resultate der verschiedenen Versuchstage global analysiert wurden, war es nicht mehr möglich, die auf M.i. spezifischen und nicht-spezifischen Hämagglutinationen voneinander scharf zu trennen. Die direkte Hämagglutination mit trypsinisierten Rindererythrocyten gab somit zu diagnostischen Zwecken keine besseren Resultate

als die einfache Paul-Bunnel-Reaktion. Wahrscheinlich verhält sich das Rinderblut der individuellen Tiere, selbst nach Trypsinbehandlung, nicht vollkommen gleichmäßig bei der direkten Titration; deshalb entstehen Variationen in der Höhe des «Normaltiters». Diese Beobachtungen haben uns wiederum überzeugt, daß keinerlei direkte Hämagglutination ohne vorherige Absorption der menschlichen Sera zur Differentialdiagnose der M.i.-Antikörper geeignet sein kann.

Wir verwendeten zur Absorption der Menschensera, bevor ihre Hämagglutination mit trypsinisierten Rindererythrocyten geprüft wurde, Meerschweinchenniere. Wir begründen diese Auswahl damit, daß die Meerschweinchenniere nicht nur F-, sondern auch S-Antigene enthält. Da die «Normalsera» S- oder S-ähnliche Antikörper enthalten, die offenbar in der Hämagglutination der Rindererythrocyten eine Rolle spielen, müssen diese Antikörper durch Absorption entfernt oder aber in ihrer Konzentration reduziert werden, wenn die M.i.-Antikörper nachgewiesen werden sollen.

Die Meerschweinchennieren wurden nach ihrer sorgfältigen mechanischen Reinigung (mit Schere) im Turmix (waring blendor) homogenisiert, lyophilisiert und fein gemahlen. Diese Manipulation ist sehr einfach. Doch sollte einmal die Frage aufgeworfen werden, ob diejenigen Fabriken, die z. B. Pepton, Trypsin usw. herstellen, nicht zur Hilfe kleinerer Laboratorien auch pulverisierte Meerschweinchenniere liefern könnten. In der Beschaffung von Meerschweinchenniere könnten einige Wassermann-Laboratorien behilflich sein, die zahlreiche Meerschweinchen zur Komplementgewinnung verwenden und die Nieren wegwerfen. Ungefähr 30 Meerschweinchennieren lieferten uns genügend lyophilisiertes Material, mit dem wir ein Jahr lang arbeiten konnten. An Stelle der Lyophilisierung können die Meerschweinchennierensuspensionen auch im Vacuumtrockenschrank bei 50° C oder bei höheren Temperaturen getrocknet werden. Wir haben an jedem Versuchstag aus Trockenpulver eine 0,5%ige Suspension in physiologischer NaCl hergestellt. Eine solche Suspension kann aber im Eisschrank mehrere Tage hindurch aufbewahrt werden.

0,1 ml der zu untersuchenden Menschensera wurden mit je 0,3 ml 0,5% Meerschweinchennierensuspension zur Absorption vermengt, geschüttelt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren wurde 0,1 ml der überstehenden Flüssigkeit in das erste Agglutinationsröhrchen abgemessen und eine weitere 0,1 ml Portion mit der Tropfenmethode (36) in Zweierpotenzen in 4 Röhrchen verdünnt. Wenn zu dieser Verdünnungsreihe je 0,2 ml 1% gewaschene trypsinisierte Rindererythrocyten zugegeben wurden, betrug das Endvolumen je 0,3 ml. Die auf das Gesamtvolumen berechneten Serumverdünnungen (auch die Absorptionsverdünnung berücksichtigt) betrugen 1:12, 1:24, 1:48, 1:96, 1:192. Die Resultate wurden in Tab. 4 zusammengefaßt.

Ohne Absorption der menschlichen Sera sind die Hämagglutinationen der M.i.-Sera einerseits und der nicht M.i.-Sera andererseits nicht durch

Tabelle 4

Agglutinintiter der mit Trypsin behandelten Rindererythrocyten

Typ des Serums	Total Sera	Anzahl Sera bei einem Agglutinintiter* von						
		12	12	24	48	96	192	192
		a) ohne Absorption der Sera						
M	26	0	0	0	0	**6**	**4**	16
nicht M	95	6	5	18	32	**21**	**13**	0
		b) nach Absorption mit Meerschweinchenniere						
M	30		2		1	6	8	13
nicht M	127	96	23	3	5	0	0	0

* auf das Endvolumen berechnet

eine scharfe Grenze getrennt, es ist vielmehr eine Überschneidung zu beobachten. Nach der Meerschweinchennierenabsorption der Sera ergab keines der 127 nicht M.i.-Sera eine deutliche Agglutination mit trypsinisierten Rindererythrocyten in einer höheren Verdünnung als 1:48. In Anbetracht dieses Umstandes konnten von 30 M.i.-Sera 27 deutlich als solche differenziert werden. Die übrigen 3 Sera wurden erst mit einer von uns modifizierten, sehr empfindlichen klassischen Absorptionsreaktion als M.i.-Sera erkannt. Ihr Hammelagglutinintiter war niedrig. Eines dieser Sera stammte aus einer späteren Rekonvaleszenzperiode.

Es ist klar, daß unsere Absorptionsreaktion auch mit einem Vergleich der direkten Titerwerte gegenüber trypsinisierten Rindererythrocyten bzw. durch Absorption mit anderen Antigenen (z. B. gereinigtes M.-Antigen) ergänzt werden kann, doch soll darauf hingewiesen werden, daß die obige Ausführung, die nach einer einfachen Absorption die Durchführung der Hämagglutination nur in 5 Röhrchen erheischt, weitaus klarere Resultate ergibt als die Paul-Bunnel-Reaktion zur serologischen Diagnose der M.i.

Da die pulverisierte Meerschweinchenniere über ein Jahr und eine konservierte (18, 6) Trypsinlösung monatelang haltbar ist, sollte eine solche Reaktion selbst den kleinsten diagnostischen Laboratorien, die bisher nur die Paul-Bunnel-Reaktion zur serologischen Diagnose der M.i. durchführten, keine Schwierigkeiten bereiten.

Für die technische Durchführung der zahlreichen Hämagglutinationsreaktionen spreche ich Frl. *A. Beckmann* meinen besten Dank aus.

Zusammenfassung

Es wird begründet, weshalb die direkte Heterohämagglutination, selbst bei Verwendung von enzymatisch vorbehandelten Erythrocyten, zur serologischen Diagnose der Mononucleosis infectiosa (M.i.) ungeeignet

ist. Das Verhalten des M-Antigens gegenüber verschiedenen proteolytischen Enzymen wird besprochen sowohl bei einer durchgreifenden enzymatischen Behandlung der Erythrocytenmembran wie bei der Grenzflächenbehandlung der Erythrocyten. Auf Grund des unterschiedlichen Verhaltens der Hammel- und Rindererythrocyten gegenüber proteolytischen Enzymen wird der Mechanismus des Wöllner-Testes abgeleitet und eine neue serologische Reaktion mit enzymatisch vorbehandelten Rindererythrocyten empfohlen. Die technische Durchführung der empfohlenen neuen Reaktion ist äußerst einfach; sie erfordert eine einzige Absorption des zu prüfenden Serums, wonach eine Hämagglutination mit trypsinisierten Rindererythrocyten in 5 Röhrchen einzustellen ist.

Résumé

L'auteur démontre pourquoi l'hétéro-hémagglutination directe ne se prête pas pour établir le diagnostic sérologique de la mononucléose infectieuse, même si l'on fait emploi d'érythrocytes traités avec les enzymes. Puis, il discute le comportement de l'antigène *M* vis-à-vis de plusieurs enzymes protéolytiques, aussi bien lorsque l'on a soumis la membrane des globules rouges à une action enzymatique profonde, que lorsque les érythrocytes n'ont été traités que très superficiellement. En se basant sur le comportement différent des globules rouges des moutons et des bœufs vis-à-vis des enzymes protéolytiques, l'on a pu expliquer le mécanisme du test de Wöllner, et l'on a pu recommander une nouvelle réaction sérologique avec les érythrocytes fermentés de bovidés. La technique de l'exécution du nouveau test est extrêmement simple; elle ne nécessite qu'une seule absorption du sérum à examiner, ensuite on peut exécuter dans 5 tubes l'hémagglutination avec des érythrocytes de bœufs traités à la trypsine.

Riassunto

Si dimostra per quale motivo l'etero-emoagglutinazione diretta, anche con l'impiego di eritrociti fermentati, non sia adatta alla diagnosi serologica della mononucleosi infettiva. Si discute il comportamento dell'antigene *M* verso diversi enzimi proteolitici, tanto in rapporto ad una energica azione enzimatica sulla membrana eritrocitaria, quanto nell'azione sulle superfici di contatto degli eritrociti. Sulla base del diverso comportamento degli eritrociti di montone e di bue verso enzimi proteolitici si deduce il meccanismo del Test di Wöllner, e viene raccomandata una nuova reazione con eritrociti di bue previamente trattati con enzimi. La nuova reazione raccomandata è di esecuzione estremamente facile; essa esige un unica assorbimento del siero in esame, dopodichè si pro-

cederà all'emoagglutinazione in 5 provette con eritrociti di bue trattati alla tripsina.

Summary

Reasons are given why the direct hetero-haemagglutination, even with use of enzyme-treated erythrocytes, is unsuitable for serological diagnosis of mononucleosis infectiosa. The behaviour of *M*-antigen towards different proteolytic enzymes is discussed, both with an intensive enzymatic treatment of the erythrocyte membrane, and also with cautious surface treatment of the intact erythrocytes. On the basis of differences in behaviour of sheep and ox erythrocytes towards proteolytic enzymes, the mechanism of the Wöllner Test is explained, and a new serological reaction with enzyme-treated ox erythrocytes is recommended. The technical execution of the new reaction recommended is very simple: it requires a single absorption of the serum to be tested and then a haemagglutination test with trypsin-treated ox erythrocytes in 5 tubes.

1. *Bailey, G. H.*, und *Raffel, S.:* J. clin. Invest. **14,** 228 (1935). – 2. *Beer, P.:* J. clin. Invest. **15,** 591 (1936). – 3. *Bender, C. E.:* Ann. intern. Med. **49,** 852 (1958). – 4. *Blumenthal, G., Bardelle, B.*, und *Rothe, G.:* Z. Immunforsch. **107,** 175 (1950). – 5. *Burnet, F. M.*, und *Anderson, S. G.:* Brit. J. exp. Path. **27,** 236 (1946). – 6. *Coffin, S. F.*, und *Pickles, M. M.:* J. Immunol. **71,** 177 (1955). – 7. *Coombs, R. R. A.:* Schweiz. Z. Path. **17,** 424 (1954). – 8. *Davidsohn, I.:* J. Amer. med. Ass. **108,** 289 (1937). – 9. *Eyquem, A., Fine, J.*, und *Mailloux, M.:* Sang **25,** 664 (1955). – 10. *Glanzmann, E.*, und *Ottensooser, F.:* Schweiz. med. Wschr. **16,** 520 (1935). – 11. *Gleeson-White, M. H., Heard, D. H., Mynors, L. S.*, und *Coombs, R. R. A.:* Brit. J. exp. Path. **31,** 321 (1950). – 12. *Leyton, G. B.:* J. clin. Path. **5,** 324 (1952). – 13. *Lippelt, H.*, und *Nogalski, J.:* Z. Hyg. **136,** 177 (1953). – 14. *Markowitz, H.*, und *Simmonds, W. L.:* J. Immunol. **71,** 45 (1953). – 15. *De Meio, D. L.*, und *Walker, D. L.:* Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **98,** 453 (1958). – 16. *Misao, T.*, und *Kobayashi, Y.:* Fukuoka Acta med. **45,** 519 (1954). – 17. *Misao, T., Kobayashi, Y.*, und *Shirakawa, M.:* Sang **28,** 785 (1957). – 18. *Morton, J. A.*, und *Pickles, M. M.:* Nature **159,** 779 (1947). – 19. *Muschel, L. H.*, und *Piper, D. R.:* Amer. J. clin. Path. **32,** 240 (1959). – 20. *Nogalski, J.*, und *Lippelt, H.:* Z. Hyg. Infekt.-Kr. **136,** 476 (1953). – 21. *Paul, J. R.*, und *Bunnel, W. W.:* Amer. J. med. Sci. **183,** 90 (1932). – 22. *Pickles, M. M.:* Nature **158,** 880 (1946). – 23. *Ponder, E.:* Blood **6,** 350 (1951). – 24. *Schwarzweiss, H.*, und *Tomcsik, J.:* Schweiz. Z. Path. **11,** 445 (1948). – 25. *Schwarzweiss, H.*, und *Tomcsik, J.:* Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **69,** 558 (1948). – 26. *Schwarzweiss, H.*, und *Tomcsik, J.:* Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **72,** 693 (1949). – 27. *Simmonds, W. L.*, und *Markowitz, A.:* Amer. J. clin. Path. **22,** 730 (1952). – 28. *Sohier, R.*, und *Girier, L.:* Presse méd. **1946,** 622. – 29. *Sohier, R.*, und *Tissier, M.:* Rev. Immunol. (Paris) **10,** 211 (1946). – 30. *Sohier, R.*, und *Pierre, S.:* Ann. Inst. Pasteur **72,** 964 (1946). – 31. *Spielmann, W.:* Z. Immun.-Forsch. **109,** 475 (1952). – 32. *Springer, G. F.*, und *Rapaport, M. J.:* Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **96,** 103 (1957). – 33. *Stuart, C. A.:* Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **32,** 861 (1935). – 34. *Stuart, C. A.:* Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **32,** 861 (1935). – 34. *Stuart, C. A., Griffin, A. M., Wheeler, K. M.*, und *Battey, S.:* Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **34,** 212 (1936). – 35. *Tomcsik, J.*, und *Baumann-Grace, J. B.:* Schweiz. Z. Path. **23,** 172 (1960). – 36. *Tomcsik, J.*, und *Schwarzweiss, H.:* Schweiz. Z. Path. **10,** 407 (1947). – 37. *Tomcsik, J.*, und *Schwarzweiss, H.:* Schweiz. Z. Path. **11,** 438 (1948). – 38. *Tomcsik, J.*, und *Schwarz-*

weiss, H.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **68,** 562 (1948). – 39. *Tomcsik, J.,* und *Schwarzweiss, H.:* Schweiz. med. Wschr. **80,** 1 (1950). – 40. *Tomcsik, J.,* und *Schwarzweiss, H.:* Schweiz. Z. Path. **13,** 447 (1950). – 41. *Verlinde, J. D., de Sonnaville, L. M.,* und *Makstenieks, O.:* Antonie v. Leeuwenhoek **16,** 21 (1950). – 42. *Wheeler, W. E., Lukby, A. L.,* und *Scholl, M. L. L.:* J. Immunol. **65,** 39 (1950). – 43. *Wiener, A. S.,* und *Katz, L.:* J. Immunol. **66,** 51 (1951). – 44. *Wöllner, D.:* Klin. Wschr. **32,** 893 (1954). – 45. *Wöllner, D.:* Z. Immun.-Forsch. **112,** 290 (1955). – 46. *Wöllner, D.:* Klin. Wschr. **33,** 940 (1955). – 47. *Wöllner, D.:* Z. Immun.-Forsch. **113,** 208 (1956). – 48. *Wöllner, D.:* Z. Immun.-Forsch. **113,** 301 (1956).