

daß Patienten mit deutlicher Makroglobulinvermehrung über Jahre im wesentlichen beschwerdefrei bleiben können. WALDENSTRÖM selbst hat erst vor kurzem zu weitgehender therapeutischer Zurückhaltung in diesen Fällen geraten¹². Neuerdings wurde die bereits 1947 von WUHRMANN aufgeworfene Frage der Carcinogenese auf dem Boden länger dauernder Dysproteinämien¹³ von OLMER u. Mitarb. speziell im Hinblick auf die Makroglobulinämie aufgegriffen¹⁴. Bekannt ist ja die überdurchschnittliche Häufung von Neoplasmen bei Makroglobulinämie. Ob diese Häufung sekundäre Folge der Paraproteinämie¹⁴ oder Ausdruck einer erhöhten Bereitschaft zu somatischen Mutationen ist, was uns näher zu liegen scheint¹⁵, ist bis heute noch ungeklärt. Jedenfalls dürfte eine differente Therapie makroglobulinämischer Krankheitsbilder mit der etwaigen Absicht einer Carcinomprophylaxe ohne sonstige notwendige Indikationen vorerst nicht gerechtfertigt sein. Der von WALDENSTRÖM vertretene Grundsatz ähnlich wie bei anderen proliferativen Blutkrankheiten mit einer gezielten Therapie erst dann zu beginnen, wenn es das klinische Bild erfordert, sollte deshalb nach wie vor das ärztliche Handeln bestimmen. Als klare Indikationen für den Therapiebeginn bieten sich an: Eine Beeinträchtigung der Knochenmarksfunktion durch verdrängende Zellproliferation, stärkere Lymphknotenvergrößerungen bzw. ausgeprägtere Störungen des Allgemeinbefindens.

Die zuerst von HITZIG⁶ angegebene (von uns nur in Fall 3 kurzfristig durchgeführte) Behandlung der Makroglobulinämie mit Sulphydrylreagentien scheint der cytostatischen bzw. der Prednisontherapie insofern nachzustehen, als hier günstigenfalls eine palliative Reduktion der zirkulierenden Makroglobuline erreicht wird und die paraproteinbildenden, proliferierenden Zellen nicht getroffen werden. Darüber hinaus wird auch durch die Depolymerisierung der Makroglobuline die Paraproteinämie nicht beseitigt, weil es sich bei den entstehenden kleineren Proteinkomplexen ja nach wie vor um abartige Eiweißkörper handelt. Etwaige paraproteinbedingte Durchblutungsstörungen wären auch durch eine erfolgreiche cytostatische Therapie günstig zu beeinflussen.

Zusammenfassung. Bei 12 Patienten mit Makroglobulinämien (Makroglobulinämie Waldenström, Plasmoeytom, chronische Kälteagglutininkrankheit) wurde

vor und nach der Therapie (Cytostatica und/oder Prednison und andere therapeutische Maßnahmen) das Serum sedimentationsanalytisch und elektrophoretisch vergleichend untersucht und zusammen mit klinischem Bild und weiteren Labordaten ausgewertet. Es zeigte sich, daß in der überwiegenden Zahl der Fälle ein zum Teil erheblicher Abfall des Makroglobulingehaltes erreicht werden konnte. Die klinische Besserung war in der Mehrzahl der Fälle befriedigend oder gut.

Auf Grund der erhobenen Befunde ist der kombinierten Behandlung mit Endoxan und Prednison der Vorzug zu geben und eine genügend hohe Dosierung und möglichst lange Behandlungsdauer (mehrere Monate) anzustreben.

Literatur. ¹ LONG, L. A., J. L. RIOPELLE, M. FRANCEUR, A. PARE, P. POIRIER, M. GEORGESCO and G. COLPRON: Macroglobulinaemia. *Canad. med. Ass. J.* **73**, 726 (1955). — ² SCHMIDT, H. H.: Bericht über die Beobachtung eines Morbus Waldenström mit atypischem Verlauf. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **62**, 558 (1956). — ³ CHARMOT, G., R. VARGUES et M. FOUCHET: Splénomégalie tropicale avec Macroglobulinémie. *Effet thérapeutique possible de l'heparine dans deux cas.* *Presse méd.* **69**, No 33, (1961). — ⁴ SIEGMUND, G.: Seltene Verlaufsform eines Falles von Makroglobulinämie Waldenström. *Wien. klin. Wschr.* **45**, 773 (1962). — ⁵ SKOOG, W. A., W. S. ADAMS and J. W. COBURN: Metabolic balance study of Plasmapheresis in a case of Waldenström's Macroglobulinemia. *Blood* **4**, 425 (1962). — ⁶ HITZIG, W. H.: Immunological studies on dissociation of human macroglobulinemia. *Proc. 7th Coll. on "Protides of the Biological Fluids"*, Bruges, Belgium, May 1959. — ⁷ RITZMANN, S. E., S. L. COLEMAN and W. C. LEVIN: The effect of some mercaptanes upon a macrocyogelglobulin; modifications induced by cysteamine, penicillamine and penicillin. *J. clin. Invest.* **39**, 1320 (1960). — ⁸ RITZMANN, S. E., and W. C. LEVIN: Effect of mercaptanes in cold agglutinin disease. *J. Lab. clin. Med.* **57**, 718 (1961). — ⁹ CONWAY, N., and J. M. WALKER: Treatment of macroglobulinaemia. *Brit. med. J.* **1962**, No 5315, 1296. — ¹⁰ KAPPELER, R., A. KREBS u. G. RIVA: Klinik der Makroglobulinämie Waldenström. *Helv. med. Acta* **25**, 101 (1958). — ¹¹ WALLENFELS, K., H. SUND u. W. BURCHARD: Über den Einfluß von B 255 auf die Aggregation des Insulins in Gegenwart von Zinkionen. *Biochem. Z.* **335**, 315 (1962). — ¹² WALDENSTRÖM, J.: Störungen der Gamma-Globulin-Synthese. *Med. Klin.* **36**, 1509 (1962). — ¹³ WUHRMANN, F.: Dysproteinemie et cancer. *Schweiz. Z. Allg. Path.* **10**, 202 (1947). — ¹⁴ OLMER, J., M. MONGIN et R. MURATORE: Le rétentissement hépatique de la macroglobulinémie de Waldenström. *Presse méd.* **65**, 524 (1957). — ¹⁵ SCHUBOTHE, H., u. D. KLEMM: Chronische Kälteagglutininkrankheit und Makroglobulinämie Waldenström als isolierte und kombinierte Krankheitsbilder. (In Vorbereitung.) — ¹⁶ SCHUBOTHE, H., u. D. KLEMM: Paraproteinämie mit ungewöhnlich thermostabiler Eiweißfraktion. *Schweiz. med. Wschr.* **17**, 646 (1963).

Untersuchungen mit der Komplementbindungsreaktion anlässlich einer Coxsackie B5-Epidemie *

Von

ERNST KUWERT und HILT LENNARTZ

Aus den Laboratorien der Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung und der multiplen Sklerose (Direktor: Prof. Dr. H. PETTE),
Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf

Im letzten Dezennium ist eine große Anzahl von Veröffentlichungen über die Poliomyelitis-Komplementbindungsreaktion (KBR) erschienen. Die überwiegende Mehrzahl der Autoren befürwortet bei Einhaltung bestimmter technischer und methodischer Voraussetzungen die Durchführung dieser Methode als wertvolle Hilfsreaktion in der Poliomyelitisdiagnostik, die insbesondere bei Verwendung frischer, aktiver,

Frigen-gereinigter und konzentrierter Gewebekulturantigene im Kindesalter (geringe anamnestiche Reaktionen) zuverlässig die Erfassung typenspezifischer Antikörper gestattet und somit den methodisch ungleich schwierigeren Neutralisationstest in einer großen Zahl von Fällen ersetzen kann (LENNARTZ²⁰, LENNETTE u. a.²¹, HAAS u. a.¹⁴).

Dagegen hat sich die Coxsackie-KBR als Routine-methode bislang nicht durchgesetzt. Die Gründe hierfür liegen einmal in der großen Anzahl von distinkten Serotypen dieser Enterovirusgruppe und einem

* Auszugweise vorgetragen auf der 29. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Würzburg, April 1963.

entsprechend großen Arbeitsaufwand, sind zum anderen jedoch auch in der Schwierigkeit der Zubereitung geeigneter komplementbindender (kb.) Antigene zu suchen. Obwohl sich mehrere der Coxsackie A-Typen sowie alle bisher isolierten B-Typen in Gewebekulturen aus Affennieren-, HeLa- oder Fl-Zellen unter Ausbildung eines cytopathischen Effektes mit hohem Infektiositätstiter, der durch oftmalige Passierung noch gesteigert werden kann, vermehren, werden die Antigene für die KBR von diesen wie von anderen Coxsackie-Typen in der Hauptsache aus Muskel- oder Gehirngewebe infizierter Säuglingsmäuse hergestellt (MELNICK und KRAFT^{18, 25}, CASALS und OLITZKY⁵, HOWITT¹⁷, VIVELL u. a.^{35, 36}, DÖMÖK¹¹, VERLINDE³⁴, GOETZ¹³, LÉPINE et al.²²). Die Eliminierung der den Ablauf und die Beurteilung der KBR störenden Gewebeproteine geschieht dabei in der Hauptsache durch Behandlung der virushaltigen Gewebssuspensionen nach der Methode von WARREN u. Mitarb.³⁷ mit Protaminsulfat (MELNICK u. a.^{18, 24, 25}, DÖMÖK¹¹, VERLINDE³⁴ oder nach der Methode von CASALS und OLITZKY⁵, durch die Anwendung der Aceton-Äthyläther-Extraktion (VIVELL u. a.^{35, 36}, GÖTZ¹³). Auch die Kombination dieser beiden Methoden ist versucht worden. So behandelten LÉPINE et al.²² ihre für die Identifizierung frisch isolierter Coxsackie A-Stämme vorgesehenen kb.Mäusegewebesuspensionen zunächst mit Protaminsulfat und extrahierten sie danach mit Äther. Letztlich sei noch auf die Empfehlung von VERLINDE³⁴, der zur Entfernung der unspezifischen Proteine aus virushaltigem Mäusegewebe Bentonit vorschlägt, und auf die Untersuchungen von HOWITT¹⁷ hingewiesen, die die störenden Begleitstoffe lediglich durch Filtration entfernt und dadurch brauchbare Antigene erhält. Ein Nachteil der Herstellung kb. Coxsackie-Antigene aus infizierten Säuglingsmäusen ist jedoch in dem unterschiedlichen Virusgehalt, den das Gewebe der einzelnen Tiere aufweist, begründet. Durch die Behandlung mit Protaminsulfat oder Aceton-Äther wird auch ein Teil des virusspezifischen Antigens eliminiert. Die so gewonnenen Antigene weisen daher in der Regel nur einen geringen spezifischen kb. Titer auf, wodurch die Erfassung niedriger Antikörperwerte erschwert wird.

Dagegen zeichnen sich in Gewebekulturen gezüchtete Viruspräparate bei Einhaltung entsprechender Inkubationszeiten und Versuchsanordnungen durch Titerkonzanz und hohe Infektiositätstiter aus. Zudem ist das Verhältnis Wirtsgewebe zu Virus günstiger als im infizierten Mausorganismus. Es ist daher vorteilhaft, von den in Gewebekulturen züchtbaren Coxsackie-Virustypen kb. Antigene aus der flüssigen Phase infizierter Kulturen zu gewinnen und für diagnostische Untersuchungen zu verwenden, wie es von ARCHETTI u. a.¹ für die Coxsackie A-KBR und von RUBIN et al.³¹ für die Coxsackie B5-KBR inauguriert worden ist. Die italienischen Autoren arbeiteten bei ihren Untersuchungen über eine Epidemie von aseptischer Meningitis, die durch einen Typ der Coxsackie A-Gruppe (später klassifiziert als Typ A-23, serologisch identisch mit ECHO-Virus Typ 9) hervorgerufen wurde, mit einem auf Affennierenzellkulturen gezüchteten kb. Antigen, das vor seiner Verwendung mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren sowie auf 56° C erhitzt worden war. Die mit diesem Antigen beobachteten Antikörperwerte lagen — abhängig vom

Erkrankungsstadium in Parallelität zu den Ergebnissen des Neutralisationstestes — im Bereich von 1:8 bis 1:128. Auch RUBIN et al.³¹ verwendeten bei ihren Untersuchungen über eine Coxsackie B5-Epidemie die nicht konzentrierte virushaltige Nährflüssigkeit von Affennierenzellkulturen als kb. Antigen für die Auswertung der Doppelseren von 96 Patienten mit positiver Virusisolierung in der KBR, von denen 85 spezifische kb. Antikörper gegen das Coxsackie B5-Virus mit einem Titer von 1:8 oder darüber aufwiesen. Über die Herstellung kb. Coxsackie B-Antigene aus der flüssigen Phase infizierter KB-Zellkulturen wird auch von ROBBA und VIRAT^{29, 30} berichtet.

Im Hinblick auf die ungewöhnlich hohe Anzahl von Coxsackie B5-Erkrankungen in der Bundesrepublik während des Jahres 1962 war es notwendig, die Seren von Patienten, bei denen nach dem Vorbericht eine Infektion mit Coxsackie-Virus zu vermuten war oder aus Stuhl, Liquor oder Rachenabstrich Coxsackie-Virus isoliert werden konnte, routinemäßig in der Coxsackie B5-KBR zu überprüfen. Für die Antigenzubereitung verwendeten wir einen auf Fl-Zellen passagierten Coxsackie B5-Virusstamm. Im folgenden soll über Zubereitung, Wertigkeit und Spezifität des Antigens und die mit diesem erzielten Befunde an den Seren von Kranken mit positiver B5-Virusisolierung berichtet werden. Die klinischen und epidemiologischen Befunde werden an anderer Stelle mitgeteilt.

Material und Methoden

Virusstämme. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen arbeiteten wir mit den Coxsackie-Typen A9, B1, B2, B3, B4 und B5, die uns 1955 von DALLDORF zur Verfügung gestellt wurden und seither im hiesigen Institut in Säuglingsmäusen oder auf Gewebekulturen passagiert worden sind. Es gelangten außerdem die an Fl- oder HeLa-Zellkulturen passagierten Poliomyelitis-Virustypen I (Mahoney), II (Lansing) und III (Saukett) zur Verwendung.

Kb. Antigene. Als Ausgangsmaterial für die Zubereitung der kb. Antigene diente ausschließlich in Gewebekulturen gezüchtetes Virus. Voll ausgewachsene Einschnittzellkulturen von Fl- oder HeLa-Zellen in Penicillinolben wurden jeweils mit etwa 2×10^7 infektiösen Einheiten (ID 50 oder als Plaquebildende Einheiten) infiziert und nach Zerstörung des Zellrasens 24—96 Std p. i. geerntet. Für die Antigenherstellung wurden die Gesamtkulturen (Zentrifüßer und Erhaltungsmedium) verwendet, die zunächst im Verhältnis 1:3 im Bühler-Homogenisator 2 min lang bei 17000 U/min mit Frigen 113 (Hoechst) behandelt worden waren. Die dadurch ausgefallenen Zell- und Serumproteine werden danach durch niedertourige Zentrifugation (3500 U/min, 30 min) von der virushaltigen flüssigen Phase abgetrennt. Wie schon von HAMPARIAN u. a.¹⁵ sowie von HERTENSTEIN¹⁶ mitgeteilt, wurde durch die Frigenbehandlung die kb. Aktivität der Präparate nicht beeinflusst. Es erfolgt sodann die Anreicherung des kb. Antigens in der präparativen Ultrazentrifuge (Spinco Modell L, Rotor 30). Die freonisierten Präparate werden dabei 40 min lang bei 30000 U/min (mittleres Schwerfeld 70000 g) zentrifugiert und im 25fachen geringeren Volumen Veronalpuffer aufgenommen. Die Antigene werden nunmehr 24 Std lang bei +4° C auf dem Magnetprüfer desaggregiert und danach bis zu ihrer Verwendung bei -60° C aufbewahrt. Die Antigene werden für die Routine- und Vergleichstests in der höchsten Konzentration verwendet, die keine Auflösung der Isofixationskurve im Antigenüberschubereich mehr bewirkt (4—8 Antigen-einheiten).

Kb. Hyperimmunsere. Die kb. Hyperimmunsere stellten wir an Meerschweinchen her. Die Tiere wurden im Abstand von 8 Tagen viermal mit je 2 ml des virushaltigen freonisierten Gewebekulturüberstandes intramuskulär gespritzt. Sie erhielten 6 Wochen nach Beginn der Immunisierung eine Booster-Injektion und wurden 5 Tage danach entblutet. Die kb. Hyperimmunsere verhielten sich in jedem Falle typenspezifisch. Ihre Titerhöhe lag zwischen -log 1,8 und 3,1.

Die Antiseren wurden vor ihrer Verwendung in der KBR 45 min lang bei 56° C inaktiviert. Sie wurden für die Antigenauswertungen und Vergleichstests in derjenigen optimalen Verdünnung verwendet, die im Antikörperüberschubbereich der Isofixationskurve kein Prozonophänomen bewirkte.

Komplement (C'). Serum gesunder erwachsener Meerschweinchen, das — bei —20° C aufbewahrt — etwa 1/2 Jahr verwendbar ist. Für die Bestimmung der C' H 50 wird das C' mit dem Faktor 1,59 (logarithmisch 0,2) in Veronalpuffer bis 1:1000 verdünnt und nach Zusatz des Antigens gegen optimal sensibilisierte Hammelerythrocyten ausgewertet. Die C' H 50 wird nach der von uns mitgeteilten Methode ermittelt (MESTER und KUWERT²⁷).

Hämolytisches System (H.S.). Der Einsatz geringer Erythrocytenzahlen und entsprechend niedriger C'-Dosen erhöht die Sensibilitätsschwelle der KBR (MESTER und KUWERT²⁷, KUWERT¹⁹). Wir arbeiten daher mit einem H.S., das etwa 0,07 bis 0,1 × 10⁶ optimal sensibilisierte Erythrocyten (acht Amboceptereinheiten) enthält und bei 546 mμ nach Auflösung mit 5/8 Indicatorlösung nach BETHKE und SAVELBERG³ im Eppendorf-Photometer eine Extinktion von 0,1 aufweist.

Durchführung der KBR. Die Routineuntersuchungen werden auf Plexiglasplatten mit dem Tropfstest nach der von BLACK und MELNICK⁴ angegebenen Methode durchgeführt. Die Seren werden dabei gegen eine konstante Antigenmenge bei Verwendung von 1, 2 und 3 C' H 50 ausgewertet. Im Gegensatz zu den amerikanischen Autoren berechnen wir jedoch nicht die Avidität des Serums für C', sondern geben unsere Antikörpertiter in den herkömmlichen Verdünnungswerten an. In Abhängigkeit von etwaiger Antikomplementarität des Patientenserums erfolgt die Ablesung in der Reihe mit 2 oder 3 C' H 50. Vor Zugabe des H.S. wird der Versuchsansatz 18 Std bei +4° C und danach 2 Std bei +37° C aufbewahrt. Während für den Plattentest von jedem Reaktionspartner 0,02 ml (1/50 Dosen) verwendet werden, wurden die Versuche zur Bestimmung der Isofixationskurve (ALMEIDA¹⁰, RAPPORT und GRAF²⁸) in Fünfteldosen durchgeführt. Die Ermittlung derjenigen Antigen- oder Antiserummenge, bei der gerade 50% der im Reaktionsgemisch vorhandenen Erythrocyten hämolytisch werden, erfolgt graphisch (MESTER und KUWERT²⁷).

Patientenserum. Von 92 Patienten mit positiver Coxsackie B5-Virusisolierung wurden insgesamt 67 Doppel- und 25 Einzelerum auf kb. Antikörper untersucht. Die Auswertung wurde nach Inaktivierung der Seren in den Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 durchgeführt.

Virusisolierung. Die Isolierung des Coxsackie B5-Virus aus Stuhl, Liquor oder Rachenabstrich erfolgte auf primären Affenierenzellkulturen, die Typenbestimmung wurde im Neutralisationstest auf derselben Zellart vorgenommen.

Salzlösungen. Die Schaferythrocyten wurden bis zu ihrer Verwendung in steriler Alseverscher Lösung aufbewahrt. Für die Herstellung des H.S. sowie der Antigen-, Serum- und C'-Verdünnungen wurde ausschließlich MAYERS Veronalpuffer verwendet (SCHMIDT³²).

Ergebnisse

I. Herstellung und Wertigkeit des kb. Coxsackie B5-Antigens. Der Vorgang der Antigenzubereitung wurde bereits im Abschnitt „Material und Methoden“ ausführlich dargestellt. Tabelle I enthält die entsprechenden Werte für das Coxsackie B5-Antigen, die auch als repräsentativ für unsere Methode der Herstellung kb. Poliovirusantigene gelten können.

Der Anreicherungsseffekt entspricht etwa der Volumeneinengung. Durch den Aufarbeitungsvorgang tritt bei diesem Antigen mithin kein meßbarer Verlust an kb. Aktivität ein. Die Wertigkeit des kb. Coxsackie B5-Antigens ist mit einem Titer von 1:128 als optimal zu bezeichnen. Höhere Werte erreichten wir bislang nur bei den Poliovirustypen I

Tabelle I. Zubereitung des kb. Antigens beim Coxsackie B5-Virus

Material	Volumeneinengung	— log kb. Titer	Anreicherung
Rohantigen (GK-Überstand)	∅	0,602	∅
Rohantigen nach Frigenebehandlung 2 min 17000 U	∅	0,602	∅
Sediment nach Ultrazentrifugation 40 min/70000 g	25fach	2,312	32fach

und III, die in Fl-Suspensionskulturen mit großer Zelldichte gezüchtet wurden. Erheblich niedrigere Werte wurden dagegen mit den Coxsackie-Typen B1, B2 und B3 erzielt (Tabelle 2). Da wir die für die Herstellung kb. Antigene vorgesehenen Gewebekulturen nicht auf ihren Gehalt an infektiösem Virus

Tabelle 2. Überprüfung von 9 Enterovirustypen auf Kreuzreaktivität in der KBR

Antigen-Titration gegen optimale Meerschweinchen-Immunsrumverdünnungen bei Verwendung von 2 C' H 50. Angabe der kb. Antigentiter im negativen dekadischen Logarithmus.

Antiserum	Antigen									
		Coxsackievirustyp					Poliovirustyp			
		B1	B2	B3	B4	B5	A9	I	II	III
Coxsackievirustyp	B1	1,204	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	B2	∅	0,602	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	B3	∅	∅	1,204	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	B4	∅	∅	∅	1,806	∅	∅	∅	∅	∅
	B5	∅	∅	∅	∅	2,107	∅	∅	∅	∅
	A9	∅	∅	∅	∅	∅	2,107	∅	∅	∅
Poliovirustyp	I	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2,408	∅	∅
	II	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2,107	∅
	III	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	2,408

titriert haben, können wir hier keine Befunde über die Beziehungen zwischen Infektiositätstiter und kb. Kapazität mitteilen.

II. Spezifität des kb. Coxsackie B5-Antigens. Auf Grund der Angaben in der Literatur (MELNICK²⁴, MELNICK und KRAFT²⁵, BEEMAN und HUEBNER², GOETZ¹³, ROBBA und VIRAT³⁰) über ein antigene Verwandtschaft verschiedener Coxsackie-Typen war es von Interesse, unser Coxsackie-B5-Antigen auf Kreuzreaktivität mit anderen Coxsackie-Typen und den Poliovirustypen in der KBR zu überprüfen. Die dabei erhobenen Befunde sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefaßt.

Bei dem in Tabelle 2 veranschaulichten Versuch titrierten wir kb. Antigene der Coxsackie-Typen B1, B2, B3, B4, B5 und A9 sowie der Poliovirustypen I, II und III gegen eine konstante Dosis von kb. Hyperimmunserum der neun Enterovirustypen bei Verwendung von 1, 2 und 3 C' H 50. Dabei erhielten wir streng typenspezifische Reaktionen. Auch bei Verwendung der umgekehrten Versuchsanordnung — Titration der kb. Antiseren gegen eine konstante Dosis des kb. B5-Antigens — konnte kein Hinweis für das Vorliegen einer antigenen Überlappung der überprüften Enteroviren erbracht werden (Tabelle 3).

III. Bestimmung der optimalen kb. Antigenendosis für die Durchführung der Routine-KBR. Die Verwendung hoher Antigenendosen für die Bestimmung des Antikörpergehaltes in Patientenserum ist nicht bei jedem Antigen-Antikörpersystem vorteilhaft. Insbesondere Proteinantigene neigen zu mangelnder C'-Bindungs-

Tabelle 3. Spezifität des kb. Coxsackie-B5-Antigens in der KBR
Titration der kb. Meerschweinchen-Immunsereen gegen eine optimale kb. Antigendosis bei Verwendung von 2 C'H 50. Angabe des kb. Antiserumtiters im negativen dekadischen Logarithmus.

kb. Antiserum gegen →	Coxsackievirustyp						Poliovirustyp		
	B1	B2	B3	B4	B5	A9	I	II	III
kb. Coxsackie- virus B5- Antigen	∅	∅	∅	∅	3,107	∅	∅	∅	∅

fähigkeit im Antigenüberschubereich (bei Lipoidantigenen oder Haptenen wird ein gegenteiliges Verhalten beobachtet). Es ist daher notwendig, jedes für Routineuntersuchungen vorgesehene Antigen auf seine

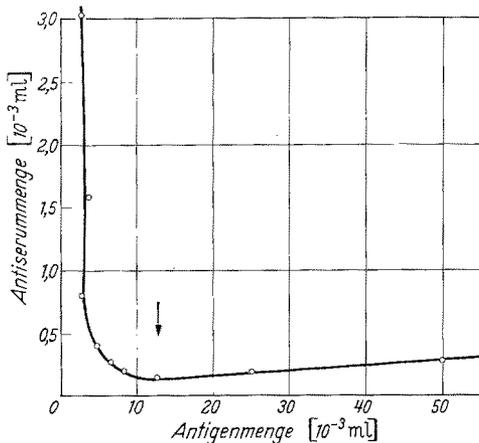


Abb. 1. Isofixationskurve des Coxsackie B5-Antigens

C'-Bindungsfähigkeit im Antigen- und Antikörperüberschubereich sowie in der Äquivalenzzone in der sog. zweidimensionalen Isofixationstechnik auszuwerten (ALMEIDA¹⁰, RAPPORT und GRAF²⁸, MAYER²³), da andernfalls niedrigere Werte an kb. Antikörpern

Tabelle 4. Reaktivität zwischen Coxsackie B5-Antigen und dem homologen kb. Antiserum vom Meerschweinchen bei Verwendung von 2,5 C'H 50
Die Tabelle enthält die Werte für den in Abb. 1 dargestellten Versuch.

Antiserum- menge ↓ (10 ⁻² ml)	Antigenmenge (10 ⁻³ ml) →								50 %iger Hämolyse- wert
	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,5	25	50	
12,5	100	100	72	50	14,5	0	0	0	3,1
6,25	100	100	100	39	10,4	0	0	0	2,3
3,13	100	100	79,1	37,5	15,6	0	0	0	2,5
1,56	100	100	94	51	10,4	0	0	0	3,2
0,78	100	100	94	44,9	15,6	8,3	0	0	2,1
0,39	100	100	100	75	25	8,3	9,4	0	4,5
0,19	100	100	100	88,5	68,7	27	61,5	69,8	8,3
0,095	100	100	100	100	88,5	88,5	87,5	91,6	—
0,048	100	100	100	100	100	100	100	100	—
50 %iger Hämolyse- wert	—	—	—	0,69	0,26	0,15	0,22	0,25	

dem Nachweis entzogen würden. Für unser Coxsackie B5-Antigen sind diejenigen Antigen- und Antikörperwerte, bei denen 50% der im Reaktionsgemisch vorhandenen sensibilisierten Erythrocyten hämolysiert wurden, in der Abb. 1 eingezeichnet worden.

Durch Verbindung der 50%igen Endpunkte der einzelnen Antigen- und Antikörperverdünnungen erhält man eine hyperbelförmige Figur, deren vertikaler, parallel zur Ordinate verlaufender Ast den Anti-

Tabelle 5. Untersuchung der Seren von Patienten mit positiver Virusisolierung in der Coxsackie B5-KBR

Anzahl der Patienten	Coxsackie B5-KBR	
	positiv	negativ
92	60 = 65,3%	32 = 34,7%
	Davon: 19 = Serum 1. Krankheitswoche 13 = Serum 2.—3. Krankheitswoche	

körperüberschubereich repräsentiert, während der über der Abszisse liegende Schenkel den Antigenüberschubereich darstellt. Die Verbindungslinie

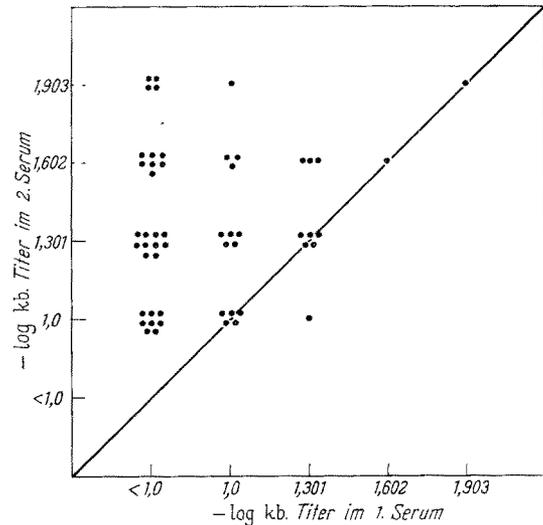


Abb. 2. Antikörpertiter in den Doppelseren von 54 Patienten mit positiver Coxsackie B5-Virusisolierung

zwischen den beiden Schenkeln verkörpert die Äquivalenzzone. Die Werte für diese Figur mögen aus Tabelle 4 entnommen werden.

Die Kurve zeigt eine Aufhellung im Antigenüberschubereich, die beim Einsatz höherer Antigenmengen noch stärker wird. Bei Verwendung von 50×10^{-3} ml Antigen pro Reaktionsansatz betrug der kb. Antikörpertiter unseres Meerschweinchenhyperimmunsereums etwa nur die Hälfte des mit der vierfach geringeren Antigenmenge ($12,5 \times 10^{-3}$ ml) beobachteten Antikörperwertes. Für die Durchführung der Routineuntersuchungen verwendeten wir daher ausschließlich $12,5 \times 10^{-3}$ ml Coxsackie B5-Antigen pro Reaktionsgemisch.

IV. Untersuchung der Seren von Patienten mit positivem Virusisolierungsbefund auf kb. Antikörper gegen das Coxsackie B5-Virus. Insgesamt gelangten 92 Patienten mit positiver Virusisolierung zur Untersuchung in der KBR. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 5 und Abb. 2 zusammengestellt.

Danach konnten bei 60 Patienten kb. Antikörper im ersten oder zweiten Serum zum Nachweis gebracht werden. Von 54 Personen, von denen uns Serumpaare aus jeweils den ersten beiden Krankheitswochen sowie nach der zweiten bis dritten Krankheitswoche zur Verfügung standen, wiesen 41 einen Titeranstieg auf,

während bei 12 Patienten in beiden Seren die gleiche Titerhöhe beobachtet werden konnte und in einem Falle eine Abnahme der kb. Antikörper festgestellt wurde (Abb. 2). Die Serumpaare wurden nach Eingang des zweiten Serums in einem Versuchsaussatz ausgetestet. Bei 6 Patienten sprach der positive Ausfall der Coxsackie B5-KBR mit dem ersten Serum für das Vorliegen einer B5-Infektion. Mit den Seren der restlichen 32 Patienten verlief die KBR negativ. In dieser Zahl sind jedoch auch diejenigen Fälle enthalten, von denen lediglich Seren aus den ersten beiden Wochen nach Auftreten der Allgemeinsymptome zur Untersuchung gelangten. Die KBR versagte in diagnostischer Hinsicht nur in 13 Fällen, von denen uns Seren aus der ersten sowie nach der zweiten bis dritten Krankheitswoche zur Verfügung standen.

Die gleichzeitig durchgeführte Testung der Seren von diesen 92 Patienten auf kb. Antikörper gegen die drei Typen des Poliovirus und gegen das Coxsackie A9-Virus ließ in 12 Fällen (= 20% der Patienten, die kb. Antikörper gegen Coxsackie B5-Virus gebildet hatten) eine schwache Reaktion gegen Typ III des Poliovirus erkennen (Titer <1:20). Wie die Tabellen 2 und 3 ausweisen, erbrachte die kreuzweise KBR mit kb. Coxsackie B5- und Poliovirus-Typ III-Antigenen und den entsprechenden Hyperimmunseren jedoch keine Hinweise für das Vorliegen einer antigenen Beziehung dieser beiden Vertreter der Enterovirusgruppe.

Diskussion

Über die epidemische Häufung von Coxsackie B5-Erkrankungen wird von SYVERTON u. a.³³, CHIN u. a.^{6, 7, 8}, CURNEN et al.⁹ sowie RUBIN u. Mitarb.³¹ berichtet. Lediglich die letztgenannten Autoren bestimmten den kb. Antikörpergehalt in den Doppelseren von 96 Patienten mit der KBR, während in den anderen Arbeiten nur der Gehalt der Seren an neutralisierenden Antikörpern mitgeteilt wird. RUBIN u. Mitarb.³¹ konnten bei 85 Patienten = 88,5% kb. Antikörper gegen das Coxsackie B5-Virus mit einem nichtkonzentrierten Affenierengewebekulturantigen zum Nachweis bringen. Eigene Untersuchungen an den Doppelseren von 67 Patienten erbrachten in 54 Fällen = 80,6% ein positives Ergebnis. Die Coxsackie B5-KBR liefert damit in einem ähnlich hohen Prozentsatz spezifische positive Resultate, wie es von der Poliomyelitis-KBR bei Beachtung der nachfolgend besprochenen technischen und methodischen Prämissen bekannt ist (LENNARTZ²⁰, LENNETTE u. a.²¹). Ihre Anwendung als Ergänzungsmethode in der Routinediagnostik der Enterovirus-Infektionen kann daher empfohlen werden.

Ebenso wie für die Durchführung der Polio-KBR verwendeten wir bei unseren Coxsackie B5-Untersuchungen Frigen-gereinigte und ultrazentrifugal angereicherte Gewebekulturantigene. Dadurch werden einmal unspezifische Reaktionen in der KBR auf ein Minimum herabgesetzt (HAMPARIAN u. a.¹⁵, HERBERTSTEIN¹⁶), zum anderen wird aber auch die Wahrscheinlichkeit der Erfassung niedriger kb. Antikörpertiter beträchtlich erhöht, wie KRAFT und MELNICK¹⁸ mit einem aus Mäusegewebe hergestellten Antigen unter Beweis stellen konnten. Dieses Antigen ergab in der KBR mit seinem spezifischen Immunserum in unkonzentrierter Form einen kb. Titer von 1:2. Nach 20facher Anreicherung des Antigens in der Ultrazentri-

fuge konnte in demselben Immunserum ein kb. Titer von 1:40 ermittelt werden.

Unser kb. Coxsackie B5-Antigen verhielt sich beim Vergleich mit acht anderen Enterovirustypen (Coxsackie B1, B2, B3, B4, A9, Polio-Typ I, II, III) in der kreuzweisen KBR streng typenspezifisch. Unsere Untersuchungen sind somit in Einklang mit den Befunden von DÖMÖK¹¹, der bei Verwendung von mit Protaminsulfat behandelten Mäusegewebsantigenen mit den Coxsackie-Typen A1 bis A10 sowie B1 bis B4 ebenfalls ausschließlich typenspezifische Ergebnisse in der KBR erhielt, und stehen im Gegensatz zu den Angaben von MELNICK²⁴ sowie ROBBIA und VIRAT³⁰. Allerdings beobachteten MELNICK und KRAFT²⁵ sowie BEEMAN und HUEBNER² nur dann heterotypische Reaktionen in der KBR, wenn sie Antiseren von Mensch oder Schimpanse verwendeten. Mit kb. Mäuseseren dagegen erhielten auch diese Autoren typenspezifische Resultate. Inwieweit hierbei quantitative Gesichtspunkte eine Rolle spielen, entzieht sich unserer Beurteilung. Keinesfalls dürfen unsere Befunde als Beweis für das Fehlen jeder antigenen Verwandtschaft zwischen den einzelnen Coxsackie-Virustypen gewertet werden. Trotz aller technischen und methodischen Verbesserungen hat die KBR eine viel geringere Sensibilitätsschwelle als der Neutralisationstest. Zuverlässige Befunde über antigenen Beziehungen in der Coxsackie-Virusgruppe können daher besser mit der quantitativen Kreuzneutralisationstechnik erbracht werden.

Vor der Verwendung eines kb. Antigens in der Routine-KBR ist es notwendig, die optimale Antigen-dosis, die keine Auflösung der Isofixationskurve im Antigenüberschubbereich bewirkt, nach der Technik von ALMEIDA¹⁰ zu ermitteln, da sich andernfalls niedrige Antikörperwerte dem Nachweis entziehen würden. Die Isofixationskurve unseres Coxsackie B5-Antigens mit seinem spezifischen Meerschweinchenhyperimmunserum zeigt in den hohen Antigenkonzentrationen ein Prozonophänomen. Bei der Bestimmung der entsprechenden Kurven für die kb. Antigene der drei Poliovirus-Typen¹⁹, die auf derselben Zellart gezüchtet und nach derselben Zubereitungsmethode wie das Coxsackie B5-Antigen hergestellt wurden, beobachteten wir außerdem das gleiche Phänomen im Antikörperüberschubbereich. ALMEIDA¹⁰ beschreibt für diese beiden Virusarten Isofixationskurven, deren Äste im Antigen- und Antikörperüberschubbereich asymptotisch zu den Koordinaten verlaufen. Dieser Autor arbeitete jedoch mit kb. Antiseren vom Pferd (Poliomyelitis, MEF 1) und von der Maus (Coxsackie A). Die von MAYER²³ angegebenen Werte für die Isofixationskurven des Poliovirus (MEF 1) mit kb. Antiserum vom Menschen entsprechen dagegen unseren Befunden. Inwieweit auch Species-spezifische Unterschiede der kb. Antikörper in den Isofixationskurven reflektiert werden, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Neben Verwendung aktiver, freonisierter und angereicherter Antigene in optimaler Konzentration kann die Sensibilitätsschwelle der KBR auch durch Beachtung folgender Gesichtspunkte erhöht werden: 1. Kältebindung; 2. Mikrotechnik nach FULTON und DUMBELL¹²; 3. Verwendung des Veronalpuffers nach MAYER. Dieser Puffer enthält die für den Ablauf der Komplementbindung notwendigen Konzentrationen

an Calcium- und Magnesiumionen in ausreichender Konzentration; 4. Reduzierung der Anzahl an sensibilisierten Erythrocyten im hämolytischen System und damit Verringerung der für den Hämolyseeffekt notwendigen Komplementdosis; 5. Bestimmung der kb. Antigen- oder Antikörpertiter nach der Methode der 50%igen Hämolyse. Letzterer Gesichtspunkt läßt sich bei Routineuntersuchungen nicht in Anwendung bringen und erübrigt sich bei Durchführung der Mikromethode eo ipso. Er sollte aber bei Experimenten mit der quantitativen KBR (MAYER²³) und bei Bestimmung der Isofixationskurven berücksichtigt werden.

Zusammenfassung. Das gehäufte Auftreten von Coxsackie B5-Erkrankungen in der Bundesrepublik während der Sommer- und Herbstmonate des Jahres 1962 gab Gelegenheit, den diagnostischen Wert der Coxsackie B5-KBR an einem größeren Patientenkollektiv zu überprüfen. Dabei wurden mit Frigen gereinigte Gewebekulturantigene (Fl-Zellen) verwendet, die nach ultrazentrifugaler Anreicherung einen typenspezifischen Titer von $-\log 1,8-2,4$ aufwiesen (Mikromethode, Plattentest, Kolmerteknik). Die optimale Antigenverdünnung für die Durchführung der Routineuntersuchungen wurde in der Isofixationstechnik nach ALMEIDA ermittelt. Die Antigene reagierten nicht mit komplementbindenden (kb.) Immunsereen gegen die übrigen Vertreter der Coxsackie B-Gruppe und ließen auch mit kb. Antisereen gegen das Coxsackie A9-Virus und die drei Typen des Poliovirus keine Reaktion in der KBR erkennen. Die typenspezifischen kb. Hyperimmunsereen wurden an Meerschweinchen hergestellt. Der homologe kb. Antikörpertiter dieser Seren betrug bei Verwendung der optimalen Antigendosis $-\log 2,8-3,1$. Die Untersuchung der Seren von 92 Patienten, bei denen aus Stuhl, Liquor oder Rachenabstrich Coxsackie B5-Virus isoliert werden konnte, erbrachte in 60 Fällen (= 65,3%) ein positives Ergebnis in der KBR und verlief in 32 Fällen (= 34,7%) negativ. In dieser letzteren Zahl sind jedoch auch diejenigen Fälle enthalten, von denen lediglich Seren aus den ersten beiden Wochen nach Auftreten der Allgemeinsymptome zur Untersuchung gelangten. Mithin verlief die KBR bei 13 Patienten mit positiver Virusisolierung negativ, von denen uns Seren aus der ersten sowie nach der zweiten bis dritten Krankheitswoche zur Verfügung standen. Die gleichzeitig durchgeführte Testung der Seren von diesen 92 Patienten auf kb. Antikörper gegen die drei Typen des Poliovirus ließ in 12 Fällen (= 20% der Seren, die kb. Antikörper gegen Coxsackie B5-Virus enthielten) eine schwache Reaktion gegen Typ III des Poliovirus erkennen. Die kreuzweise KBR mit Coxsackie B5- und Poliovirus-Typ III-Antigenen und den entsprechenden kb. Meerschweinchenhyperimmunsereen ergab keine Hinweise für das Vorliegen einer antigenen Beziehung dieser beiden Vertreter der Enterovirusgruppe. — Bei Verwendung geeigneter Antigene und einer entsprechenden Versuchsmethodik stellt die Coxsackie B5-KBR eine Ergänzung der Möglichkeiten in der Enterovirus-Diagnostik dar, die auch bei negativem virologischem Befund durch Titerdifferenz in Doppelsereen unter Umständen die Diagnosestellung ermöglicht.

Den med.-techn. Assistentinnen Fräulein IRMGARD SCHMIDT, INGRID BADER und MARIANNE MELLES danken wir für gewissenhafte und interessierte Mitarbeit.

Summary. The mass appearance of Coxsackie B5 illnesses in the Federal Republic of Germany during the summer and autumn of 1962 provided an opportunity for examining the diagnostic value of Coxsackie B5 complement fixation test in a greater number of patients. We used fluorocarbon-purified tissue culture antigens (Fl-cells) which after concentration in the ultra-centrifuge showed a type-specific titer of $-\log 1,8$ to $2,4$ (micro method, perspex plate test, Kolmer technique). The optimal antigen dilution for routine tests was assessed by means of the isofixation technique according to ALMEIDA. The antigens did not react with complement-fixing immune sera against the other types of Coxsackie B group as well as against Coxsackie A9 virus and the three types of poliomyelitis virus. The type-specific hyperimmune sera were produced in guinea pigs. The homologous complement-fixing antibody titer of these sera, when using the optimal antigen dosage, was $-\log 2,8$ to $3,1$. Examination of the sera of 92 patients with positive Coxsackie B5 virus isolation in feces, liquor or throat washings gave in 60 cases (= 65,3%) a positive result in complement fixation and showed negative findings in 32 cases (= 34,7%). This latter number contains also those cases of which only sera of the first two weeks after onset of symptoms were examined. Thus the complement fixation test showed negative results only in 13 patients with positive virus isolation whose sera were available to us from the first as well as the second to third week of illness. Simultaneous examinations of the sera of these 92 patients for complement-fixing antibodies against the three types of the poliovirus demonstrated in 12 cases (= 20% of the sera which contained complement-fixing antibodies against Coxsackie B5 virus) a weak reaction to type III of poliovirus. The cross-wise complement fixation test with Coxsackie B5 and poliovirus type III antigens and the corresponding complement-fixing guinea pig hyperimmune sera gave no indications of an antigenic relationship of these two members of the enterovirus group. When applying suitable antigens and an adequate test method, the Coxsackie B5 complement fixation test offers a supplement to the possibilities in enterovirus diagnostic which also in the case of negative virological findings might make a diagnosis possible.

Literatur. ¹ ARCHETTI, I., A. FELICI, F. RUSSI and C. FUÀ: Researches on the etiologic agent of the marche meningo-neuraxitis during the epidemic outbreak of the summer and autumn of 1955. *Sci. med. ital.* **5**, 321—354 (1956). — ² BEE-MAN, E. A., and R. J. HUEBNER: Evaluation and serological methods for demonstrating antibody responses to group A Coxsackie (Herpangina) viruses. *J. Immunol.* **68**, 663—672 (1952). — ³ BETHKE, K., u. W. SAEVLSBERG: Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämiglobin. *Biochem. Z.* **320**, 431—442 (1949/50). — ⁴ BLACK, F. L., and J. L. MELNICK: The specificity of the complement fixation test in poliomyelitis. *Yale J. Biol. Med.* **26**, 385—393 (1954). — ⁵ CASALS, J., and P. K. OLITSKY: Complement fixation tests with some of the viruses in the Coxsackie group. *Fed. Proc.* **9**, 570—573 (1950). — ⁶ CHIN, T. D. Y., P. H. LEHAN, H. RUBIN, and H. A. WENNER: Epidemic infection with Coxsackie virus group B, type 5. II. Virus excretion and neutralizing antibody response. *Amer. J. Hyg.* **67**, 321—330 (1958). — ⁷ CHIN, T. D. Y., P. H. LEHAN, H. RUBIN, I. L. DOTO, R. H. HEEREN, H. A. WENNER and M. L. FURCELOW: Epidemiological studies of aseptic meningitis caused by Coxsackie virus B5. *Amer. J. publ. Hlth* **48**, 1193—1200 (1958). — ⁸ CHIN, T. D. Y., J. C. GREENE and H. A. WENNER: Infections with Coxsackie

virus B5 in six midwestern states. Publ. Hlth Rep. (Wash.) **73**, 563—567 (1958). — ⁹ CURNEN, E. C., A. H. LONDON, E. TANABE, W. P. GLEZEN and J. KOOMEN: An epidemic of aseptic meningitis attributable to Coxsackie B5 virus. Amer. J. Dis. Child. **96**, 571—573 (1958). — ¹⁰ DE ALMEIDA, J. O.: Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement fixation tests. J. Immunol. **76**, 259—263 (1956). — ¹¹ DÖMÖK, I.: Isolation of Coxsackie virus strains from infections occurred in the years 1952—1954 and their identification. Acta microbiol. Acad. Sci. hung **3**, 95—108 (1955). — ¹² FULTON, F., and K. R. DUMBELL: The serological comparison of strains of influenza virus. J. gen. Microbiol. **3**, 97—110 (1949). — ¹³ GOETZ, O.: Die Bedeutung der Komplementbindungsreaktion für die Diagnostik von Coxsackie-Infektionen. Z. Kinderheilk. **82**, 217—226 (1959). — ¹⁴ HAAS, R., R. THOMSEN, G. MAASS, M. BADRAN, O. VIVELL u. H. SÜTTERLE: Virologische Untersuchungen und klinische Beobachtungen nach oraler Poliomyelitis-Schutzimpfung. Dtsch. med. Wschr. **88**, 557—564 (1963). — ¹⁵ HAMPARIAN, V. V., F. MÜLLER and K. HUMMELER: Elimination of nonspecific components from viral antigens by fluorocarbon. J. Immunol. **80**, 468—475 (1958). — ¹⁶ HERTENSTEIN, CH.: Herstellung eines komplementbindenden Antigens für die Poliomyelitisdiagnose. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **178**, 413—420 (1960). — ¹⁷ HOWITT, B. F.: Isolation and Differentiation of the Coxsackie group of viruses. Fed. Proc. **9**, 574—580 (1950). — ¹⁸ KRAFT, L. M., and J. L. MELNICK: Immunological reactions of the Coxsackie viruses. II. The complement fixation test. J. exp. Med. **92**, 483—497 (1950). — ¹⁹ KUWERT, E.: Unveröffentlichte Versuche 1962. — ²⁰ LENNARTZ, H.: Coxsackie- und ECHO-Virusisolationen 1958 (Korrelation zwischen Erkrankung und Virustyp). Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **176**, 385—389 (1959). — ²¹ LENNETTE, E. H., R. L. MAGOFFIN and N. J. SCHMIDT: Observations on the complement-fixing antibody response in human poliomyelitis. Influence of age and vaccination status. J. Immunol. **89**, 358—366 (1962). — ²² LÉPINE, P., J. VIRAT et L. CHAUMONT: Le diagnostic sérologique des virus Coxsackie du groupe A. Ann. Inst. Pasteur **103**, 475—483 (1962). — ²³ MAYER, M. M.: Complement and complement fixation. In: KABAT and MAYER, Experimental immunochemistry, 2nd Ed. Springfield (Ill.): Ch. C. Thomas 1961. — ²⁴ MELNICK, J. L.: The Coxsackie group of viruses. Ann. N. Y. Acad. Sci. **56**,

587—595 (1953). — ²⁵ MELNICK, J. L., and L. M. KRAFT: Differentiation of immunological types among the Coxsackieviruses. Fed. Proc. **9**, 585—591 (1950). — ²⁶ MELNICK, J. L., N. LEDINKO, A. S. KAPLAN and L. M. KRAFT: Ohio strains of a virus pathogenic for infant mice (Coxsackie group). Simultaneous occurrence with poliomyelitis virus in patients with „Summer grippe“. J. exp. Med. **91**, 185—195 (1950). — ²⁷ MESTER, TH., u. E. KUWERT: Über die Bestimmung der 50%igen Hämolyse und deren Beziehung zur Anzahl der sensibilisierten Erythrocyten bei der Komplementauswertung. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 1963 (im Druck). — ²⁸ RAPPORT, M. M., and L. GRAF: Immunochemical analysis based on complement fixation. Ann. N. Y. Acad. Sci. **69**, 608—632 (1957). — ²⁹ ROBBA, L., et J. VIRAT: Préparation d'antigènes pour la déviation du complément dans le diagnostic sérologique des affections à virus Coxsackie, group B. Ann. Inst. Pasteur **99**, 784—791 (1960). — ³⁰ ROBBA, L., et J. VIRAT: Les réactions croisées dans la déviation du complément pour le diagnostic sérologique des affections à entérovirus avec les antigènes Coxsackie groupe B et ECHO. Ann. Inst. Pasteur **100**, 524—530 (1961). — ³¹ RUBIN, H., P. H. LEHAN, I. L. DOTO, T. D. Y. CHIN, R. H. HEEREN, O. JOHNSON, H. A. WENNER and M. L. FURCELOW: Epidemic infection with Coxsackie virus group B, type 5. I. Clinical and epidemiological aspects. New Engl. J. Med. **258**, 255—263 (1958). — ³² SCHMIDT, H.: Die Konglutination — Das Komplement. In: Fortschritt der Immunitätsforschung, Bd. 1. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff 1959. — ³³ SYVERTON, J. D., D. M. MCLEAN, M. M. DA SILVA, H. B. DOANY, M. COONEY, H. KLEINMAN and H. BAUER: Outbreak of aseptic meningitis caused by Coxsackie B5 virus. J. Amer. Med. Ass. **164**, 2015—2019 (1957). — ³⁴ VERLINDE, J. D.: Coxsackie group. WHO, regional office for Europe. Advisory group on the control of neurotropic virus diseases. Copenhagen 14.—19. 4. 1958. — ³⁵ VIVELL, O., u. J. SCHAIRER: Typenbestimmungsversuche bei in Deutschland isolierten Coxsackie-Virusstämmen. Arch. ges. Virusforsch. **5**, 84—94 (1953). — ³⁶ VIVELL, O., u. K. OSTER: Über die diagnostische und klinische Bedeutung der Coxsackie-Komplementbindungsreaktion. Ärztl. Wschr. **8**, 58—63 (1953). — ³⁷ WARREN, J., M. L. WEIL, S. B. RUSS and H. JEFFRIES: Purification of certain viruses by use of protamine sulfate. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **72**, 662—664 (1949).

Die Beeinflussung des Frühgeborenen-Ikterus durch Wehenmittel*

Von

H. MENTZEL und H. WOLF

Aus der Universitäts-Kinderklinik Göttingen (Direktor: Prof. Dr. G. JOPPIGH)

Die Häufigkeit eines verstärkten Ikterus neonatorum bei Frühgeborenen hat durch den Nachweis eines Mangels an Glucuronyl-Transferase in der nicht ausgereiften Leber ihre Erklärung gefunden (BROWN u. BURNETT; LATHE u. WALKER). Einige klinische Beobachtungen beim Frühgeborenenikterus lassen sich jedoch nicht allein auf die vorliegende Leberunreife zurückführen. Beim Vergleich von Frühgeborenen-Gruppen aus verschiedenen Kliniken fällt eine erhebliche Streuung der Intensität und der Frequenz des Frühgeborenenikterus auf, die durch die Annahme von methodischen Differenzen oder Mängeln bei der Bilirubinbestimmung kaum ausreichend begründet werden kann. Es ist deshalb auf die Möglichkeit hingewiesen worden, daß additive exogene Faktoren die Entwicklung des Frühgeborenenikterus beeinflussen (LUCEY). MARTIUS beobachtete bei Neugeborenen nach erschwerter Geburt häufiger eine Verstärkung des Ikterus neonatorum und prägte den Begriff des Belastungsikterus. Vergleichsuntersuchungen von SCHEL-LONG ergaben keine signifikante Abweichung des Mittelwertes der maximalen Bilirubinkonzentration bei Neugeborenen mit Geburtskomplikationen. Bei eige-

nen Verlaufsuntersuchungen des Ikterus neonatorum an 97 Frühgeborenen zeigten sich gleichfalls stärkere Streuungen der maximalen Bilirubinwerte, auch innerhalb von Gruppen mit vergleichbarem Reifegrad (bestimmt nach den von v. HARNACK u. OSTER angegebenen Kriterien). Dieses unterschiedliche Verhalten vermittelte gleichfalls Anhaltspunkte für die Begünstigung des Frühgeborenenikterus durch zusätzliche Faktoren.

Im Rahmen einer umfassenderen Untersuchung über eine exogene Beeinflussung der Ikterusintensität fiel bei einigen Zwillingspaaren, bei denen ein übereinstimmender Reifegrad der Leber am ehesten angenommen werden darf, ein abweichender Verlauf des Ikterus neonatorum auf (Tabelle 1). Bei der Verabreichung von Wehenmitteln vor der Geburt des ersten Zwillinges entwickelten die Erstgeborenen einen deutlich stärkeren Ikterus als die Zweitgeborenen. Wenn zur Entwicklung des zweiten Zwillinges Wehenmittel erforderlich waren, lag das Bilirubinmaximum beim zweiten Zwilling wesentlich höher. Bei medikamentös unbeeinflusster Spontangeburt wichen die maximalen Bilirubinwerte bei beiden Zwillingen nur geringfügig voneinander ab.

Auf Grund dieser Befunde vermuteten wir einen Zusammenhang zwischen der Anwendung von Wehen-

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.