

**Kritik der Methodik
der Wassermannschen Reaktion
und neue Vorschläge für die
quantitative Messung der
Komplementbindung**

Von

J. KAUP

Mit 7 Abbildungen



München und Berlin 1917
Druck und Verlag von R. Oldenbourg

Inhaltsübersicht.

	Seite
Einleitung	1
I. Allgemeine Methodik.	
A. Die Agentien des hämolytischen Systems	3
1. Die Menge der Blutkörperchen als Hämolyseobjekt	6
2. Hämolytisches, inaktiviertes Immuneserum	12
B. Einfluß der Flüssigkeitsmenge	24
C. Gesetzmäßigkeit in den Beziehungen zwischen Aktivserum und inaktiviertem Immuneserum	32
Ergebnisse für das hämolytische System	46
II. Verschiedene Methoden und die eigene Methode.	
A. Verschiedene Methoden	48
B. Kritische Besprechung der Art der einzelnen Methoden	58
1. Bestimmung des Ambozeptortiters und der Gebrauchsdosis	61
2. Alexintiter und Gebrauchsdosis	66
3. Das Patientenserum	71
4. Die Organextrakte und deren Gebrauchsdosis	74
C. Unsere Methodik.	.
1. Wahl unserer Methodik	89
2. Vorversuche und Hauptversuch.	
a) Vorversuche	96
b) Hauptversuch	100
D. Vorzüge unserer Methode.	
1. Für die Extraktprüfung	108
2. Für die Beurteilung des Patientenserums	120
Zusammenfassung für den Abschnitt II	127
III. Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Methoden	128
A. Methoden mit inaktiviertem Patientenserum.	
1. Die Original-Wassermann-Methode	131
2. Methoden mit abgestuften Serum- oder Extraktmengen	141
3. Methoden mit Cholesterinzusatz	145
B. Methoden mit nicht inaktiviertem (Aktiv-) Serum	147
C. Spezifität und Empfindlichkeit unserer Methodik.	
1. Spezifität	158
2. Empfindlichkeit der Methodik	164
Zusammenfassung für den Abschnitt III	174

Kritik der Methodik der Wassermannschen Reaktion und neue Vorschläge für die quantitative Messung der Komplementbindung¹⁾.

Von

Prof. Dr. J. Kaup (München), gemeinsam mit **Irmgard Balsler**,
Dr. med. **Hatziwassiliu** (Griechenland) und Pharmazeutfährnich
J. Kretschmer.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität München. Vorstand:
Geheimer Rat Prof. Dr. Max von Gruber.)

Einleitung.

Die Sicherheit und Verlässigkeit einer Methodik ist gewährleistet durch die völlige Klärung der Beziehungen der einzelnen Agentien, die für eine Methode Verwendung finden. Dies gilt für jede Methode, ganz besonders jedoch für eine Methode, wie die von Wassermann, A. Neisser und Bruck angegebene Serodiagnostik der Syphilis, die zur verbreitetsten klinisch-serologischen Methode in den letzten Jahren geworden ist.

Die Wa. R. als indirekte Methode der Komplementbindung für den Nachweis der Antikörper (Luesreagine nach Citron) hat mit 5 verschiedenen Agentien zu tun, durch deren namhafte Zahl die Technik wesentlich erschwert ist. Die geringste qualitative oder quantitative Veränderung in der Beschaffenheit des einzelnen Agens kann einen Einfluß auf das Ergebnis der Reaktion ausüben.

1) Die wesentlichen Ergebnisse wurden durch Untersuchungen im Handlaboratorium des k. und k. Armeeoberkommandos festgestellt, woselbst ich als Hygienereferent bis Weihnachten 1916 tätig war. An den Untersuchungen in Teschen war Herr J. Kretschmer, an denen in München Frau Irmgard Balsler und Herr Dr. med. Hatziwassiliu beteiligt. Prof. Kaup.

Erleichtert wird allerdings die Methodik durch den sinnfälligen und einfachen Vorgang der Hämolyse auf Grund der Komplementwirkung. Der Vorgang der Reaktion mit ihren 2 Teilen — Zusammenwirken von Antigen (spezifischer oder unspezifischer Extrakt), Patientenserum als Antikörper und Aktivserum als Komplement (Alexin) — erfordert ebenso wie der Zusatz des hämolytischen Systems als Mischung von roten Blutzellen und entsprechenden Erythrozyten-Antiserum eine genaue quantitative Dosierung.

Nach der Ehrlichschen¹⁾ Auffassung besteht die Annahme, daß eine Verankerung des Alexins an das Antiserum als ein Vorgang fester chemischer Bindung zu betrachten sei und als Reaktionsprodukt sich bereits vor der Einwirkung auf die Blutzelle das Hämolsin bilde. Auch Arrhenius²⁾ nimmt eine chemische Bindung von Ambozeptor und Komplement in bestimmten Mengenverhältnissen hingegen im Innern der Blutzelle als feststehende Tatsache an und bringt die Art dieser Bindung in verschiedenen Molekulargleichungen zum Ausdruck. Eine Reihe anderer Autoren, wie Morgenroth und Sachs, Scheller und andere, spricht von wechselnden Verhältnissen in den Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement. Vielfach wird noch an der Fermentnatur des Komplements festgehalten, wie auch Ehrlich das Komplement für ein proteolytisches Enzym gehalten hat. Von einer Klärung der quantitativen Beziehungen im hämolytischen System kann daher noch keine Rede sein. Immer wieder wird auf die Notwendigkeit neuer Untersuchungen über die quantitativen Verhältnisse hingewiesen. In größeren Einzeldarstellungen über die Hämolyse und auch über die Serodiagnostik der Syphilis ist infolge dieser Unsicherheit den näheren Beziehungen zwischen Ambozeptor und Komplement fast ängstlich aus dem Wege gegangen. Den wenig befriedigende Stand der Ansichten über das Wesen und die Methodik der Wa. R. hat Müller³⁾ treffend

1) E. u. Morgenroth, Berl. kl. W. 1899, Nr. 1 u. 22; 1900, Nr. 21 u. 31; 1901, Nr. 10, 21 u. 22.

2) Immunochemie, Leipzig 1907.

3) Die Serodiagnose der Syphilis, Urban und Schwarzenberg, 1913.

in die Worte zusammengefaßt: „Mit der Unkenntnis des Zustandekommens der Komplementbindung bei Lues hängt es zum großen Teil zusammen, daß wir heute weniger als je über eine einheitliche Methode verfügen und daß auch die Bewertung der Urteile keine gleichmäßige ist. Es vergeht keine Woche, die nicht neue Tatsachen über Theorie und Praxis der Reaktion bringt oder frühere Ansichten umstößt; keine wissenschaftliche Debatte findet statt, ohne daß schroffste Gegensätze aufeinander stoßen.“ Eine einheitliche Methode oder wenigstens eine genauere Klarstellung der quantitativen Beziehungen der einzelnen Komponenten der Wa. R. zueinander ist nach dem vorgeführten dringender denn je. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die unausgesetzten Abänderungsvorschläge ihren Grund in Fehlern oder Unsicherheiten der bisherigen Methoden haben müssen. Es sind zwar in den letzten Jahren eine Reihe von Arbeiten entstanden, die zum Teil auch auf die Technik der Reaktion Einfluß ausübten; die Unklarheiten sind jedoch noch nicht beseitigt. Die Wichtigkeit des Gegenstandes erfordert ein näheres Eingehen auf die Resultate der einzelnen Forschungen, und die mannigfachen Unklarheiten haben zugleich für eigene Versuche nach verschiedenen Richtungen Veranlassung gegeben. Diese Untersuchungen wurden zunächst in dem Handlaboratorium des k. u. k. Armee-Oberkommandos angestellt und fanden später ihre Fortsetzung im Hygienischen Institut der Universität München¹⁾.

I. Allgemeine Methodik.

A. Die Agentien des hämolytischen Systems.

Für das hämolytische System hat Wassermann von Anfang an Hammelblutkörperchen in Vorschlag gebracht; später wurden auch andere Blutarten benützt, wie Pferdeblutkörperchen von Detre sowie von Ballner und Decastello, Ziegenblut von

1) Die Fortführung dieser letzteren Untersuchungen war wesentlich erleichtert durch die munifizente Zuwendung eines größeren Betrages seitens des Herrn Generaldirektors v. Hochstetter der Holzverkohlungs-Industrie-Aktiengesellschaft in Konstanz, wofür an dieser Stelle der herzlichste Dank ausgesprochen wird.

Boas, Ochsenblutkörperchen von Browning, Menschenblut von Noguchi usw. Den Hammelblutkörperchen werden bestimmte Vorzüge gegeben. Es wird darauf hingewiesen, daß die Normalambozeptoren im Patientenserum ein besonderes hämolytisches Vermögen für Hammelblutkörperchen besitzen — weniger für Ziegenblut und gar nicht für Rinderblut — und daß sie dadurch die antikomplementäre Wirkung der Organextrakte und auch der Untersuchungssera am besten auszugleichen imstande sind. Auch jetzt noch werden, nach den guten Erfahrungen im Verlaufe der Jahre, für Hämolyseversuche fast allgemein Hammelblutkörperchen verwendet. Als hämolytisches Antiserum wird in diesem Falle das Serum von Kaninchen gewählt, welches mit Hammelblut vorbehandelt ist. Als Alexin (Komplement) wird frisches Meerschweinchenserum allgemein bevorzugt.

Für alle Hämolyseversuche muß als Medium eine isotonische Kochsalzlösung Verwendung finden, d. h. alle Verdünnungen und Ergänzungen auf ein bestimmtes Volumen dürfen nur mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen werden. In diesem Medium bleibt das Volumen der Blutzellen infolge gleicher Druckverhältnisse das normale, das Stroma dicht genug, um das Hämoglobin nicht austreten zu lassen. Werden gewaschene Blutkörperchen in destilliertes Wasser gebracht, so tritt bekanntlich sofort Hämolyse ein. Die Stromahülle reißt bei geändertem Druck infolge zu starker Volumzunahme; aber bereits Kochsalzlösungen von geringerer oder stärkerer Konzentration üben auf die quantitativen Beziehungen der beiden andern Reagentien des hämolytischen Systems — das Alexin (Komplement) und das Hammelblut-Antiserum — bestimmte Wirkungen aus. Besteht z. B. das Medium nur aus 0,5proz. Kochsalzlösung, so führt eine Spur von Alexin bereits bei einer normalen Menge von sensibilisierten Hbl. Hämolyse herbei; wird hingegen als Medium eine hyper-tonische Kochsalzlösung gewählt, z. B. eine 1,5proz. Lösung, so ist der Alexinbedarf ein wesentlich größerer als in physiologischer Kochsalzlösung. In einer Reihe von Versuchen haben wir diese Unterschiede des Komplementbedarfs in verschiedenen Kochsalzlösungen festzustellen gesucht und stets dasselbe Resultat

erhalten. Im wesentlichen sind diese Wahrnehmungen eine Bestätigung der umfassenden Versuche von Kiß¹⁾. Die osmotischen Vorgänge bei den Blutzellen sind besonders eingehend von Koepp²⁾ geschildert. Wie destilliertes Wasser schnellstens Hämolyse herbeiführt, so gibt es noch eine Reihe von Substanzen, welche allein, d. h. ohne Ambozeptor oder ohne Komplement den Austritt des Hämoglobins aus dem Stroma bewirken. Diese chemischen Substanzen wirken in den stärksten Verdünnungen, bei denen osmotische Druckunterschiede keine Rolle spielen können. Zu diesen Blutgiften gehören alle Alkalien, Äther, Alkohol, Chloroform, Sublimat, die Gallensäuren und vor allem auch die Saponin-substanzen. Noch bedeutungsvoller als alle diese Substanzen, die eine unspezifische Hämolyse herbeizuführen vermögen, sind Stoffe, die umgekehrt eine unspezifische Hemmung der Hämolyse bewirken. Bakterien, Zellemlusionen und Organextrakte sind durchwegs Substanzen, die eine antikomplementäre, eine eigenhemmende Wirkung entfalten können. Doch äußert sich diese Wirkung — nach der Ansicht der einzelnen Autoren — nicht durch eine vermehrte Widerstandskraft der Blutkörperchen gegen die Hämolyse, sondern durch Bindung des Komplements, das für die Hämolyse in einer bestimmten Menge stets erforderlich ist.

Eine weitere Voraussetzung für jede Versuchsanordnung zum Studium des hämolytischen Systems ist die Verwendung des gleichen Volumens. Die Mengen der einzelnen Agentien müssen stets in einem bestimmten Volumen aufeinander einwirken. Wir werden später zu erörtern haben, welchen Einfluß Volumsveränderungen ausüben.

Für den Eintritt der Hämolyse ist ferner von Bedeutung die Temperatur, bei der die einzelnen Agentien aufeinander wirken. Wenn auch bei Zimmertemperatur und auch bei Kälte der Vorgang der Hämolyse sich einstellt, so wirkt doch der Aufenthalt im Blutschrank beschleunigend. Die Beurteilung eines Ergebnisses wird daher von der Temperatur und von der Zeitdauer des Auf-

1) Z. f. I. Bd. 3, 1909, S. 558.

2) Physikalische Chemie in der Medizin, Hölder, 1900.

enthaltet bei den einzelnen Temperaturen in hohem Grade abhängen.

Wie bereits angedeutet, tritt die spezifische Hämolyse nur ein beim Einwirken von Antiserum (Ambozeptor) und Alexin (Komplement) auf Blutkörperchen. Fehlt das Antiserum oder das Alexin oder sind deren Mengen ungenügend, so bleibt die Hämolyse aus.

Von allen diesen Agentien müssen jedoch ganz bestimmte Mengen vorhanden sein, um eine vollständige Hämolyse herbeizuführen. Diesen quantitativen Beziehungen wollen wir unsere besondere Aufmerksamkeit widmen.

1. Die Menge der Blutkörperchen als Hämolyseobjekt.

Bekanntlich kommen bei Hämolyseversuchen die Blutkörperchen, durch wiederholtes Waschen von den Serumbestandteilen befreit, als 1,0, 5,0 oder 10proz. Aufschwemmungen in isotonischer Kochsalzlösung (0,85 Proz.) zur Anwendung. Bei einem Gesamtvolumen des für die Reaktion verwendeten Gemisches von 2,5 ccm werden gewöhnlich 0,5 ccm der z. B. 5proz. Aufschwemmung, bei 5 ccm gewöhnlich 1,0 ccm dieser Aufschwemmungen genommen. In dem ersteren wie letzteren Falle ist der Anteil der Blutkörperchenmenge an diesem Volumen zwar der gleiche, die Aufschwemmungsdichtigkeit dieselbe, die Menge der Blutkörperchen als Hämolyseobjekt jedoch doppelt so groß. Es sind jedoch auch Komplementbindungsmethoden in Anwendung, bei denen 1 oder 10proz. Blutkörperchen-Aufschwemmungen benutzt werden. Auch kommt es auf die Herstellung der Aufschwemmung an. Das eine Laboratorium zieht bei Bereitung der Hbl.-Aufschwemmung das Volumen des defibrierten Blutes in Berechnung, das andere das Volumen der gewaschenen Erythrozyten. Wir füllten stets auf die Marke des ungewaschenen Blutes auf.

Den Einfluß der Erythrozytenmenge auf den lytischen Effekt im hämolytischen System haben Fleckseder und Steyskal¹⁾

1) Wiener kl. W. Nr. 14, 1908, S. 499.

besonders hervorgehoben. Bei Reagenzglasversuchen über die Lösung von Menschenblut durch dagegengerichtetes Kaninchen-serum und aktivierendes Menschenserum, war es wiederholt aufgefallen, daß in Reihen mit steigenden Erythrozytenmengen der lytische Effekt bei bestimmten Proben trotz ihres größeren Gehaltes an aktivierendem Bestandteile geringer ausfiel als in den vorhergehenden Röhrchen. Um diese Wahrnehmung genauer zu studieren, stellte Noda¹⁾ eingehende Versuche an. Ansteigende Mengen von 10proz. Hbl.-Aufschwemmungen wurden mit je 0,2 ccm $\frac{1}{10000}$ inaktiven Hbl.-Immunserum vom Kaninchen durch $\frac{1}{2}$ Stunde in der Wärme digeriert und nach Zusatz von 0,01 ccm aktives Serum der Lösungseffekt nach 2stündigem Verweilen im Brutschrank beobachtet. Während bei 0,3 ccm 10proz. Hbl. der Lösungseffekt ein vollständiger war, wurden mit der steigenden Erythrozytenmenge (bis 3,0 ccm) immer geringere Anteile — bewertet mittels des Sahlischen Hämoglobinometers — gelöst, so bei 1 ccm Hbl. etwa 50 Proz., bei 2 ccm 25 Proz. und bei 3 ccm Hbl. nur etwa 15 Proz.

Nach diesen Versuchsergebnissen, die eigentlich nur erkennen lassen, daß eine bestimmte Menge Anti-Hammelblutserum und Alexin von steigenden Mengen Blutkörperchen nur bestimmte Anteile zu lösen imstande sind, hat Noda eine Kurvengleichung berechnen lassen, die mit den Versuchsergebnissen in einem bestimmten Widerspruch steht. Daß die Erythrozytenmenge nicht ohne Einfluß auf den Ausfall der Hämolyse ist, haben auch Maslakowitz und Liebermann²⁾ erkannt. Sie hatten die Vorstellung, daß eine bestimmte Menge Meerschweinchenserum von bestimmter komplementärer Energie nur eine streng bestimmte Menge sensibilisierten Erythrozyten zu hämolysieren vermag. Jede Veränderung ihres gegenseitigen Verhältnisses sowohl im Sinne der Vergrößerung der Menge der Erythrozyten wie auch im Sinne einer Verringerung der Menge des Meerschweinchenserums führte zu einer partiellen oder kompletten Hemmung der Hämolyse.

1) Z. f. Bakt. I. Abt., Orig.-Bd. 50, H. 3, 1909, S. 401.

2) Z. f. I. Bd. 2, 1909, S. 557.

Leschly¹⁾, dem wir eine umfassende Studie über die Beziehungen zwischen Komplement und Ambözeptor verdanken, hat in einem kurzen Versuch bei absteigenden Mengen einer 5proz. Hbl.-Aufschwemmung und verschiedenen Alexinmengen den jeweiligen Bedarf an Immuserum bestimmt und hierbei gefunden, daß für eine 2½proz. Aufschwemmung der Bedarf an Immuserum 0,0002, für eine 5proz. Aufschwemmung 0,0004 und für eine 10proz. Aufschwemmung 0,0008 betrug, gleichgültig, ob er 0,05 Komplement, 0,1 oder 0,2 Komplement (Alexin) verwendete. Leschly hat diesen Versuch nur nebenbei erwähnt und hierbei weniger Gewicht auf den Bedarf an Antiserum als an Alexin gelegt. Es schien daher angezeigt, durch besondere Versuche zunächst den Zusammenhang zwischen den Mengen an Hbl. und Antihammelblutserum völlig zu klären. Die nächsten Versuche wollen darüber Aufschluß geben

Gesamtmenge 2,5 ccm, hievon 0,5 ccm der verschiedenen proz. Hbl.-Aufschwemmungen, 0,5 ccm des Antierythrozytenserums in den angegebenen Verdünnungen, 0,05 ccm des frischen Meer-schweinchensersums als Komplement (Alexin), 1 ccm einer 0,85-rozzentigen Kochsalzlösung zur Auffüllung, welcher Zusatz bereits zu den Hbl.-Aufschwemmungen gegeben wurde. Die Ablesungen erfolgten nach Verweilen von ½ Stunde im Brutschrank und nach einer weiteren Stunde bei Zimmertemperatur.

1) Z. f. I. Bd. 24, H. 5, 1916.

Immuserum- verdünnungen	Nach ½ Stunde Brutschrank								Nach 1 weiteren Stunde Zimmertemperatur							
	Versuch I				Versuch II				Versuch I				Versuch II			
	2,5%	5%	7,5%	10%	2,5%	5%	7,5%	10%	2,5%	5%	7,5%	10%	2,5%	7,5%	5%	10%
1: 500	L	L	L	dH	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
1: 1000	L	L	L	cH	L	L	L	L	L	L	L	fcH	L	L	L	L
1: 1500	L	L	dH	cH	L	L	dH	fcH	L	L	sH	cH	L	L	sH	fcH
1: 2000	L	sH	cH	cH	L	sH	fcH	cH	L	L	dH	cH	L	L	dH	cH
1: 2500	ssH	fcH	cH	cH	L	dH	cH	cH	L	fcH	cH	cH	L	sH	fcH	cH
1: 3000	dH	cH	cH	cH	L	fcH	cH	cH	L	cH	cH	cH	L	dH	cH	cH
1: 3500	cH	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH
1: 4000	cH	cH	cH	cH	sH	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH	L	cH	cH	cH

Der Titer des Immunserums war von den Serumwerken in Dresden mit 1 : 2000 angegeben; wiederholte Titerbestimmungen ergaben zumeist den gleichen Titer bei Verwendung von stets 0,05 ccm Aktivserum, selten einen niedrigeren oder höheren Titer.

Die für die Versuche gestellte Frage läßt sich nach den Ergebnissen eindeutig beantworten: Bei steigenden Hbl.-Mengen ist in demselben Verhältnis eine steigende Menge von Immunserum zur Hämolyse bei einem bestimmten Komplementüberschuß erforderlich. Für die Gesamtmenge von 2,5 ccm waren

für die	2,5 proz. Hbl.-Aufschwemmung	0,00025	Immunserum,	Titer	1:4000
„ „	5 proz. „ „	0,0005	„ „	„	1:2000
„ „	7,5 proz. „ „	0,001	„ „	„	1:1000
„ „	10 proz. „ „	0,002	„ „	„	1:500

notwendig. Allerdings war der Titer für die 10proz. Hbl.-Aufschwemmung beim II. Versuch nicht 1:500, sondern 1:1000, doch zeigen die nächsten Hemmungswerte mit *sH*¹⁾ und *fcH* für die beiden letzten Aufschwemmungen derartige Unterschiede, daß für die 10proz. Aufschwemmung ein Mehrbedarf an Immunserum ebenfalls zu erkennen ist. Die gleichgebliebene Komplementmenge, die für die 2,5proz. Hbl.-Aufschwemmung einen größeren Überschuß als für die 10proz. darstellt, scheint den Ausfall nicht beeinflußt zu haben.

Umstritten ist die Frage, ob zwischen Komplementmenge und gelöster Blutmenge ein bestimmtes Verhältnis besteht. Scheller²⁾ hat diese Frage folgendermaßen zu lösen versucht: Blutkörperchen in 10 proz. Aufschwemmung wurden mit einer gleichen Menge von Immunkörperlösung von 1:1000

1) Die Ablesung gibt den Zustand der Hbl.-Körperchen direkt an — keine Lösung des Hbl. als *cH* = komplette Hemmung, Spuren einer Lösung mit *fcH* = fast komplette Hemmung, stärkere Lösung, aber noch mit Hbl. am Grunde, sog. kleine Kuppe, *dH* = deutliche Hemmung, und fast vollständige Lösung in 2 Abstufungen mit *sH* = schwache Hemmung und *ssH* = sehr schwache Hemmung. Mit diesen Bezeichnungen ist lediglich der Zustand der Lösung oder des Unbeeinflußtseins als Hemmung der Blutkörperchen zum Ausdruck gebracht.

2) Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, 56. Bd., S. 124.

sensibilisiert; von diesen sensibilisierten Blutkörperchen wurden Mengen von $\frac{1}{2}$ ccm bis 8 ccm steigend genommen, das Volumen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 9 ccm gebracht und nun zu dieser Menge der sensibilisierten Blutkörperchen-aufschwemmung absteigende Mengen von Alexin und zwar von 0,04 ccm bis 0,00125 ccm, aufgefüllt auf 1 ccm gegeben. Es zeigte sich nun, daß die Komplementmenge von 0,04, 0,02 und 0,01 ccm auch bei der größten Menge sensibilisierter Blutkörperchen ausreichte, um vollständige Hämolyse herbeizuführen. Die kleineren Alexinmengen jedoch erzielten einen immer unvollständigeren Effekt und in der keinsten Dosis nur mehr Spuren einer Hämolyse. Scheller folgert aus diesem Ergebnis, daß das Komplement, sofern die angewandte Konzentration, in welcher es wirkt, dieselbe bleibt, quantitativ die gleiche Wirkung entfaltet, unabhängig von der Menge der sensibilisierten Blutkörperchen, auf welche es wirkt. Hier wird bereits die Bedeutung der Konzentration des Komplements hervorgehoben, die wir später ausführlich erörtern wollen. Scheller erwähnt im Texte jedoch andere Versuche, wonach bei gleicher Immunkörpermenge beim Zusetzen von verschieden großen Mengen von Blutkörperchen eine mit der Menge der Blutkörperchen steigende Konzentration von Komplement zur Lösung notwendig war.

Andere Untersucher haben die Angaben Schellers nur teilweise bestätigen können. Liefmann und Andreew¹⁾ fanden, daß das Komplement, welches mehr Blutkörperchen als die Menge, für welche es bestimmt ist, zu lösen vermag, komplette Lösung nur bei einer unbedeutend größeren Menge hervorrufen kann.

Leschly²⁾ kam zu den gleichen Ergebnissen und fand, daß die für eine bestimmte Blutmenge erforderliche Komplementmenge im Maximum nur die doppelte Blutmenge komplett zu lösen vermöge. Die relativ gelösten Blutmengen schwankten jedoch in den einzelnen Versuchen recht bedeutend. Eigene Versuche hatten folgende Ergebnisse:

1) Z. f. I. Orig.-Bd. 11, 1911, S. 355.

2) l. c.

Tabelle II.

Komplement- Abstufungen	Nach 1/2 Stunde Brutschrank								Nach 1 weiteren Stunde Zimmertemperatur							
	Versuch I				Versuch II				Versuch I				Versuch II			
	Hbl.-Aufschwemmungen in Prozenten															
	2,5	5	7,5	10	2,5	5	7,5	10	2,5	5	7,5	10	2,5	5	7,5	10
0,020	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
0,018	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
0,016	»	»	»	»	»	»	»	ssH	»	»	»	»	»	»	»	»
0,014	»	»	»	»	»	»	»	sH	»	»	»	»	»	»	»	»
0,012	»	sH	»	»	»	»	ssH	fcH	»	»	»	»	»	»	»	»
0,010	»	fcH	»	»	»	»	dH	cH	»	dH	»	»	»	»	»	fcH
0,008	»	cH	dH	»	sH	dH	cH	»	»	cH	»	»	»	ssH	sH	cH
0,006	sH	»	cH	cH	fcH	cH	»	»	»	fcH	fcH	sH	dH	cH	»	»
0,004	fcH	»	»	»	cH	»	»	»	fcH	»	cH	cH	cH	cH	»	»
0,002	cH	»	»	»	»	»	»	»	cH	»	»	»	»	»	»	»

Gesamtmenge: Stets 2,5 ccm und zwar 0,5 ccm verschieden proz. Hbl.-Aufschwemmung, 0,5 ccm des 4fachen Ambozeptor-titers der jeweiligen Hbl.-Menge, abgestufte Komplementmengen und Ergänzung auf die Gesamtmenge mit physiologischer Kochsalzlösung.

Der 4fache Ambozeptor wurde aus bestimmten, später zu erörternden Gründen gewählt.

Der Komplementbedarf war ungeachtet der steigenden Blutkörperchenmenge bei diesem Ambozeptorüberschuß ein annähernd gleicher oder nur wenig erhöhter. Zum mindesten ist ersichtlich, daß nicht entsprechend dem für die größere Erythrozytenmenge gesteigerten Ambozeptorbedarf auch in gleicher Weise gesteigerte Alexinmengen für die Hämolyse erforderlich waren. Gleichzeitige Versuche mit gleich gesteigerten Blutkörperchenmengen und der einfachen im Vorversuch ermittelten Ambozeptordosis ergaben ebenfalls nur einen wenig gesteigerten Komplementbedarf. Die Reaktion verlief nur träger. Spätere Versuche mit 2 1/2, 5, 10 und 15proz. Hbl.-Aufschwemmungen ergaben hinsichtlich des in gleicher Weise gesteigerten Bedarfs an Immuns-erum stets dasselbe Resultat. Der Komplementbedarf war bei Verwendung der 4- oder 5fachen im Vorversuch ermittelten

Ambozeptordosis bei steigenden Erythrozytenmengen stets nur wenig gesteigert.

Wir enthalten uns einstweilen, weitergehende Schlüsse aus diesen Resultaten zu ziehen. Wir wollen vielmehr auf die engeren Beziehungen zwischen Komplement (Alexin) und Immuneserum (Ambozeptor) bei gleichbleibender Erythrozytenmenge näher eingehen.

2. Hämolytisches, inaktiviertes Immuneserum (Ambozeptor, Präparin) und Aktivserum (Komplement, Alexin).

Die quantitativen Beziehungen dieser beiden Agentien im hämolytischen System wurden zunächst von Dungern¹⁾ angedeutet, als er den Beweis zu bringen suchte, daß der Immunkörper und das Komplement (Alexin) im Immuneserum quantitativ von einander unabhängig sind. Die hämolytische Wirkung von Immuneseren wurde durch Zusatz von Komplement (normales Kaninchenserum) in einzelnen Fällen ganz außerordentlich gesteigert. Konnte frisches Serum eines mit Rinderblut vorbehandelten Kaninchens z. B. die 10fache Menge 5proz. Rinderblutes vollständig lackfarben machen, so vermochte es bei genügendem Zusatz von Aktivserum, die 320fache Menge vollkommen aufzulösen. Je mehr Immunkörper in dem einzelnen Immuneserum vorhanden war, desto bedeutender wurde die Verstärkung der hämolytischen Wirkung durch den Komplementzusatz. Gruber²⁾ wies bei der Besprechung der Wirkung bakterizider Immunesera darauf hin, daß hochgradig präparierte (sensibilisierte) Menschenblutkörperchen durch ein Minimum von aktivem Normalserum (0,02 bis 0,04 ccm) gelöst werden können. Auch schon vorher hat Gruber³⁾ nach den Erfahrungen mit Agglutinine betont, daß die Wirkung der Immunesera streng den angewendeten Mengen proportional ist.

1) M. med. W. Nr. 20, 1900, S. 677.

2) W. kl. W. Nr. 15, 1902, S. 387.

3) M. med. W. Nr. 46, 47, 48 u. 49, 1901.

Eingehender behandelten Morgenroth und Sachs¹⁾ die Frage der quantitativen Beziehungen von Ambozeptor und Komplement. Bei ihren Versuchen wurde stets mit 5proz. Blutkörperchenaufschwemmungen und gleichen Flüssigkeitsvolumen gearbeitet. Versuche mit Hammelblut, Hammelblut-Antiserum und Meerschweinchenserum als Komplement ergaben bei steigenden Ambozeptormengen (meist von 0,05 ansteigend bis 0,4 oder 0,5) im allgemeinen einen abnehmenden Komplementbedarf. Doch war der Komplementbedarf für die gleiche Menge von 0,05 ccm Ambozeptor in 4 Versuchsreihen sehr verschieden (0,008, 0,025, 0,1 und 0,08). Wurde die Ambozeptormenge ungefähr um das 10fache erhöht, so war der Komplementbedarf zweimal um das 6fache, ein drittes Mal um etwa das 10fache vermindert. Die Beziehungen für diese Kombinationen wurden dahin ausgedrückt, daß bei Gegenwart größerer Ambozeptormengen kleinere Komplementdosen zur Hämolyse genügen. Viel weniger ausgesprochen war jedoch die Erscheinung mit der Kombination Ochsenblut, entsprechenden Antiserum und Meerschweinchenserum als Komplement. Bei Erhöhung der Ambozeptormengen bis auf die 100fache Dosis verringerte sich der Komplementbedarf bei 2 Versuchen nur um das 3 bzw. 4fache, in einem Falle sogar nur um das $1\frac{1}{2}$ fache. Als besonders charakteristisch wird von den Autoren die Erscheinung hervorgehoben, daß der geringste Komplementbedarf bei einem geringen Multiplum der Ambozeptoreinheit beinahe erreicht ist und mit weiterer Vermehrung des Ambozeptors sich nicht mehr wesentlich ändert. Eine Erklärung dieser Erscheinung versuchten Morgenroth und Sachs mit dem Hinweis auf die schwankende Menge der Rezeptoren für die Blutkörperchen, auf die verschiedenen Aviditätsverhältnisse von Ambozeptor und Komplement und schließlich mit dem Hinweis auf die Vielheit der Ambozeptoren. Die zum Schluß ausgesprochene Ansicht, daß sich die verschiedenen Phänomene in Verhältnis von Ambozeptormenge und Komplementbedarf mit Berücksichtigung der drei erwähnten Faktoren in ungezwungener Weise er-

1) B. kl. W. Nr. 35, 1903, S. 817.

klären lassen, können wir nicht teilen. Eine einfachere Erklärung soll am Schlusse dieser Abhandlung versucht werden.

In der Folge wurden von Noda¹⁾ die Lösungseffekte bei fallenden Mengen von Immuneserum festzustellen gesucht, die ebenfalls theoretisches Interesse beanspruchen. Zunächst ist die Wahrnehmung von Noda bemerkenswert, daß man gelegentlich Meerschweinchenserum antrifft, die eine gewisse Menge von Hbl.-Körperchen im Kontrollversuch ohne hämolytisches Immuneserum direkt zu lösen vermögen. Mit diesem Hinweis ist angedeutet, daß eben hier und da Aktivsera mit einer nicht unbeträchtlichen Menge an Normalambozeptoren gefunden werden. Diese Sera wurden aus den Versuchen ausgeschaltet. In einer Versuchsreihe verwendete er eine konstante Menge von Erythrozytenbrei, ebenso eine konstante Menge von Meerschweinchenserum als Alexin (Komplement) 0,05 ccm und wechselte lediglich die Konzentration des Immuneserums von einer Verdünnung 1:10000 in 5 Stufen bis zu 1:50000. Hierbei ergab sich, daß der Lösungseffekt nahezu völlig proportional mit der abnehmenden Menge an Immuneserum geringer wurde. Dieses Versuchsergebnis deckte sich mit einem Befund von Liebermann und Fenyvessy²⁾. Diese beiden Autoren fanden ebenfalls bei Versuchen mit konstanten Komplementmengen und Verdünnungen eines inaktivierten Immuneserums bei gleichen Erythrozytenmengen proportional diesen Verdünnungen auch eine Verringerung des Lösungseffektes auf Grund von Hämoglobinbestimmungen. Auch Manwaring³⁾ hatte bei ähnlichen Versuchen ein gleiches Ergebnis. Alle diese Versuche brachten eigentlich nur die Bestätigung, daß eine Proportionalität zwischen den Blutkörperchen- und Immuneserummengen für die Hämolyse besteht, die bereits im Jahre 1901 von Gruber erkannt worden war. Bei steigenden Erythrozytenmengen muß auch die Menge an Immuneserum entsprechend gesteigert werden, und bei gleichen Erythrozytenmengen und fallenden Ambozeptordosen nimmt der hämolytische Effekt in gleichem Maße ab.

1) Z. f. Bakt. Orig.-Bd. 50, H. 3, S. 405.

2) Biochem. Ztschr. V. Bd., H. 1, 1907.

3) Zentralbl. f. Bakt. Abt. 1, Orig.-Bd. 40, 1906.