

AKTIVE SERA BEI DER KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION. FAKTOREN DER SENSIBILITÄT UND UNSPEZIFISCHER ERGEBNISSE

ZEITSCHRIFT FÜR IMMUNITÄTSFORSCHUNG. Bd. 70. 1931. Heft 1/2

In einer früheren Arbeit(1) habe ich bereits Eigenheiten der aktiven Sera, insbesondere die antihämolytische Fähigkeit und die ko-fixierende Eigenschaft für den hämolytischen Ambozeptor behandelt. Im folgenden sollen einige besondere Eigenschaften dieser Sera in unmittelbarer Beziehung zu der Komplementbindungsreaktion bei der Syphilis untersucht werden.

Das Bestreben, die Methoden mit aktiven Sera weiter auszubauen, ist besonders darauf zurückzuführen, dass sie gegenüber den Methoden mit inaktivierten Seren eine grössere Sensibilität zeigen, sowohl im Sinne stärkerer Reaktionen als auch eines grösseren Prozentsatzes positiver Ergebnisse. Dem steht als Nachteil stets ein mehr oder weniger hoher Prozentsatz unspezifischer Resultate gegenüber.

Eine Hauptschwierigkeit für die Erkenntnis der hierbei wirkenden Faktoren ist das Vorhandensein des normalen hämolytischen Systems in den aktiven menschlichen Seren. Infolge dieser Eigenschaft lassen sich die Versuchsbedingungen nicht gleich gestalten, da seine Werte bei den einzelnen Seren und sogar bei dem gleichen Serum von einem Tage zum andern schwanken. Bei einzelnen Seren werden ausserdem die Verhältnisse durch das Vorhandensein antihämolytischer Eigenschaften kompliziert, die durch das eben erwähnte hämolytische System verdeckt werden. Es handelt sich also darum, diese Fehlerquellen auszuschalten.

Der Weg, der hierbei gegangen wurde, ist die Verwendung menschlicher Sera, die durch eine Suspension formolfixierter Hammelblutkörperchen ihres normalen hämolytischen Systems (Antihammelblutkörperchen-Ambozeptor und Komplement) beraubt werden. Nach dieser Behandlung können die Seren ohne vorherige Erwärmung mit einem fremden hämolytischen System untersucht werden, wobei sich ihre Reaktionen mit denen inaktivierter Seren vergleichen lassen.

(1) *M. C. Rubino*, Reacción de desviación del complemento para el diagnóstico de la sífilis. Técnica con absorción del sistema hemolítico natural. 4. Conferencia Sudamericana de Microbiología e higiene. Buenos Aires, 1926. — *Ders.*, Über die antihämolytischen Eigenschaften des Menschenserums. Erscheint Zentralbl. f. Bakt., Abt. I. Orig. — *Ders.*, Zur Verwendung formolfixierter Hammelblutkörperchen. Erscheint ebendort.

Versuchsbedingungen

Bei allen Untersuchungen wurden folgende Einheiten benutzt:

Blutkörperchensuspension. Für die Suspension der natürlichen und der formolvorbehandelten Blutkörperchen beträgt die Einheit 1 ccm. Benutzt wurde eine 5proz. Suspension gewaschener Hammelblutkörperchen, die vorher mit 0,85proz. Kochsalzlösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt waren.

Hämolysin. Einheit ist die Menge, welche mit 0,4 ccm im Verhältnis 1:10 verdünntem Meerschweinchenkomplement mit 1 ccm der schon erwähnten Blutkörperchensuspension Hämolyse ergibt.

Komplementeinheit ist die Menge Meerschweinchenserum, die mit $\frac{1}{2}$ Einheit Hämolysin 1 ccm der Blutkörperchensuspension komplett löst.

Ich habe diese Sensibilisierung benutzt, um die Komplementeinheit zu ermessen, damit die Resultate meiner Untersuchungen vergleichbar sind(1).

Bemerkung über das Ablesen der Resultate: Zum Ablesen der Hämolyse habe ich die Skala von Vernes benutzt, welche die verschiedenen Schattierungen zu notieren gestattet. H^0 entspricht keiner Hämolyse, H^8 entspricht ebenso wie H^k kompletter Hämolyse. Die Nummern zwischen 0 und 8 entsprechen den Zwischengraden der Hämolyse, wobei der Grad der Hämolyse mit dem Wert der Ziffern ansteigt. H^{fk} entspricht fast kompletter Hämolyse.

Die Formolfixierung geschieht auf folgendem Wege:

Hammelbluterythrozyten werden wie für die Reaktion nach Bordet-Wassermann gewaschen und sodann mit physiologischer Kochsalzlösung bis zum doppelten Originalblutvolumen aufgefüllt. Hierauf wird 10 Proz. Formalin zugesetzt (35—40proz. Formaldehyd) und die Mischung nach gutem Durchschütteln bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 18 Stunden sind die Blutkörperchen schon brauchbar und werden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Beim Zentrifugieren bildet sich eine teigige Schicht, von der die Flüssigkeit direkt abgegossen werden kann. Zur Herstellung einer völlig homogenen Suspension muss mit einem Glasstäbchen umgerührt und sehr kräftig durchgeschüttelt werden.

Die Sensibilisierung der formolbehandelten Blutkörperchenaufschwemmung führen wir in folgender Weise durch:

Für 10 ccm einer 20proz. Aufschwemmung berechnet man die Zahl der Blutkörpercheneinheiten. Nach dem letzten Zentrifugieren setzt man vor Zusatz der Kochsalzlösung das berechnete Hämolysin zu.

Die Behandlung der Sera mit formalinbehandelten Blutkörperchen wurde in folgender Weise ausgeführt:

- a) Menschliche Seren, 1:2,5 verdünnt, 1 ccm / Serum-
- b) Formolbehandelte Blutkörperchen 20:100 1 ccm \ verdünnung 1:5.

Gut schütteln und 1 Stunde bei 37° in den Brutschrank.

Es ist zweckmässig, die Röhrchen nach einer halben Stunde noch einmal durchzuschütteln, da die Blutkörperchen dazu neigen, sich abzusetzen.

(1) Vergleichsweise wurde auch eine mit 5proz. vom Vollblutvolumen (nicht vom Sediment) hergestellte Blutkörperchensuspension benutzt, um die Blutkörperchenkonzentration in der Suspension natürlicher und formolbehandelter Blutkörperchen zu vergleichen. Letztere ergeben in derselben Konzentration ein kleineres Sediment.

I. KO-FIXIERENDE EIGENSCHAFTEN DER NICHT ERWÄRMTE MENSCHLICHEN SEREN

An anderer Stelle habe ich bewiesen, dass die nicht erwärmten menschlichen Seren die Eigenschaft besitzen, die Absorption des hämolytischen Ambozeptors durch die Blutkörperchensuspension (formalinbehandelte Blutkörperchen) zu steigern. Diese als Ko-Fixierung bezeichnete Eigenschaft erstreckt sich nicht nur auf den hämolytischen Ambozeptor, sondern auch auf das System Antigen—Syphilitischer Antikörper—Komplement.

Nimmt man verschiedene syphilitische und normale menschliche Seren, die vorher durch Erwärmen inaktiviert wurden, und lässt sie in einer Reihe ohne Zusatz in fallender Menge auf das Luesantigen und Komplement einwirken, in einer zweiten Reihe unter Zusatz eines normalen, nicht erwärmten menschlichen Serums, so beobachtet man, dass bei den syphilitischen Seren das Resultat in der zweiten Serie immer stärker ist als in der ersten. Ebenso wie das menschliche Serum verhält sich auch das Hammelserum, nicht indessen das Meerschweinchenserum, das auf den Ausfall der Reaktion wenig oder gar keinen Einfluss hat.

Diese Eigenschaft des menschlichen Serums geht bei vorheriger Inaktivierung verloren. Bei der Erwärmung auf 50° während 30 Minuten verschwindet ein Teil dieser ko-fixierenden Eigenschaften.

Wie bei allen Versuchen mit nicht erwärmten Seren, muss man besonders bei der Absorption des hämolytischen Systems die Möglichkeit berücksichtigen, dass antihämolytische Eigenschaften auftreten. Die anzuwendenden menschlichen Seren, oder besser deren Mischung, muss also vorher von diesem Gesichtspunkt aus geprüft werden.

Versuch vom 21 März 1930

- 1) 5 menschliche Luesserer, nach Wassermann positiv.
- 2) Eine Mischung von 3 menschlichen normalen, nicht inaktivierten Seren.
- 3) Hammelserum.
- 4) Meerschweinchenserum.
- 5) Antigen Bordet-Ruelens, 1:20 verdünnt.
- 6) Meerschweinchenkomplement, 1:15 verdünnt.

Versuchsordnung. 4 Serien. Bei der ersten wurden nur die inaktivierten Seren benutzt, bei der anderen inaktiviertes Serum plus nicht erwärmtes menschliches Normalserum, bei der dritten inaktiviertes Serum plus Hammelserum, und bei der vierten inaktiviertes Serum plus Meerschweinchenserum. Die Mischung des inaktivierten Luesserums mit den anderen, vorher durch Zusatz formolbehandelter Blutkörperchen ihres hämolytischen Systems beraubten Seren ging folgendermassen vor sich:

<i>Mit Menschenserum</i>	<i>Mit Hammelserum</i>	<i>Mit Meerschweinchen- serum</i>
Luesserum 0,2 ccm	Luesserum 0,2 ccm	Luesserum 0,2 ccm
nicht erwärmtes menschliches Serum 0,1 ccm	Hammelserum 0,1 ccm	Meerschweinchen- serum 1:4 0,1 ccm
Physiologische Kochsalzlösung 0,2 ccm	Physiologische Kochsalzlösung 0,2 ccm	Physiologische Kochsalzlösung 0,2 ccm
20 proz. formalinbehandelte Suspension, sensibilisierte mit 2 E. Hämolysin pro globuläre Einheit 0,5 ccm	Ebenso 0,5 ccm	Ebenso 0,5 ccm

Jedes einzelne Röhrchen wurde durchgeschüttelt und nach 1 Stunde Aufenthalt im Brutschrank bei 37° zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf das doppelte Volumen aufgefüllt. Hierbei ergaben sich folgende Verdünnungen der Seren:

Luesserum — Verdünnung 1:10.

Unerwärmte Seren — Verdünnung 1:20.

Hammelserum — Verdünnung 1:20.

Meerschweinchen- — Verdünnung 1:80. (Das Meerschweinchen- serum wurde in grösserer Verdünnung angewandt, da wegen seines stärkeren Komplementgehaltes die Absorption sonst unvollständig wäre.)

Siehe Tabelle I.

Der Zusatz menschlichen Serums und des Hammelserums hat die Reaktionen beträchtlich verstärkt. Andererseits hat das Meerschweinchen- serum die Reaktionen eher etwas abgeschwächt, was möglicherweise auf eine zurückbleibende Komplementmenge zurückzuführen wäre, möglicherweise aber auch auf die von Gengou (1909) beschriebene Hämolysebegünstigung durch dieses Serum.

Bei diesem Versuch, der häufig wiederholt wurde, handelt es sich auf keinen Fall um antihämolytische Erscheinungen. Denn abgesehen davon, dass die nicht erwärmten menschlichen Seren vorher daraufhin genau untersucht wurden, zeigte sich die beobachtete Erscheinung nie in den Kontrollröhrchen. Ausserdem wirken die Seren in erster Linie bei einer Dosis von 0,3 ccm des 1:20 verdünnten Serums (d. h. 0,015 ccm nicht erhitzten Menschenserums) gegenüber einer Dosis von 0,5 ccm im Verhältnis 1:15 verdünnten Meerschweinchenkomplements.

Eher ist der Versuch angelegt, nicht die wirkliche Intensität der ko-fixierenden Kraft nachzuweisen, da die Dosis des nicht erwärmten menschlichen Serums nach und nach mit der Dosis des Luesserums geringer wird anstatt gleichmässig zu bleiben. Diese Versuchsanordnung erklärt auch, warum die ko-fixierende Eigenschaft in den Röhrchen N.^o 2 und 3 der Serie nicht mit gleicher Stärke zutage tritt.

Tabelle I.

Röhrchen N.º	Inaktivierte Luesseren				Inaktivierte Luesseren + unerwärmtes Menschenserum				Inaktivierte Luesseren + Hammelserum				Inaktivierte Luesseren + Meerschweinchen- serum			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Serum	0,3	0,1	0,05	0,3	0,3	0,1	0,05	0,3	0,3	0,1	0,05	0,3	0,3	0,1	0,05	0,3
Antigen 1:20	0,3	0,3	0,3	—	0,3	0,3	0,3	—	0,3	0,3	0,3	—	0,3	0,3	0,3	—
Komplement 1:15	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl	—	0,2	0,25	0,3	—	0,2	0,25	0,3	—	0,2	0,25	0,3	—	0,2	0,25	0,3
1 Std. 37°. — 1 ccm Suspension sensibilisierter Hammelblutkörperchen. Ablesen nach 30 Minuten Brutschrankaufenthalt bei 37°																
Serum N.º																
595	H ^r	H ^k	H ^k	H ^k	H ^o	H ^r	H ^k	H ^k	H ^r	H ^r	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k
596	H ^r	H ^k	H ^k	H ^k	H ^o	H ^r	H ^k	H ^k	H ^o	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k
597	H ^o	H ^o	H ^o	H ^k	H ^o	H ^o	H ^o	H ^k	H ^o	H ^o	H ^{k?}	H ^k	H ^o	H ^o	H ^r	H ^k
613	H ^o	H ^k	H ^k	H ^k	H ^o	H ^r	H ^k	H ^k	H ^o	H ^r	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k
615	H ^r	H ^k	H ^k	H ^k	H ^o	H ^r	H ^k	H ^k	H ^o	H ^r	H ^k	H ^k	—	—	—	—

II. ZUR REAKTIONSFÄHIGKEIT MENSCHLICHER, NICHT DURCH HITZE INAKTIVIERTER SERA.

Mit einigen menschlichen Luesseren wird folgender Versuch angestellt:

Jedes Serum wird in drei Teile geteilt. Der eine bleibt ohne jede Behandlung im nativen Zustande. Der zweite wird zur Entziehung des hämolytischen Systems mit formolbehandelten Blutkörperchen vorbehandelt. Der dritte Teil wird durch Erwärmen auf 55° während 20—30 Minuten inaktiviert. Mit jedem dieser drei Teile werden folgende beiden Versuche angestellt:

a) Eine Komplementbindung mit einem Luesantigen unter den gewöhnlichen Bedingungen.

b) Mischung von Antigen und Serum allein ohne Komplementzusatz.

Nach 1 Stunde Brutschrankaufenthalt bei 37° verfährt man wie bei der Wassermannschen Reaktion. Zu der Serie a) werden die sensibilisierten Blutkörperchen zugesetzt. Zu der Serie b) setzt man ausser den sensibilisierten Blutkörperchen noch die gleiche Komplementmenge zu, wie im Versuch a) benutzt war.

Nach einem Aufenthalt von 30 Minuten im Brutschrank bei 37° lassen sich folgende Ergebnisse ablesen:

1) Bei dem inaktivierten Teil der Seren finden sich positive Resultate nur bei der Serie a), nicht indessen bei der Serie b).

2) Bei den nativen, unbehandelten Seren finden sich positive Reaktionen in der Serie a), ausserdem einige auch in der Serie b).

3) Bei den mit formolfixierten Blutkörperchen behandelten Seren finden sich in Serie a) und b) positive Reaktionen, und zwar mit grösserer Klarheit.

Bei diesen Versuchen gingen wir folgendermassen vor:

Für die Absorption des hämolytischen Systems wurden die mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von 1:2,5 verdünnten Seren mit dem gleichen Volumen einer 20proz. Suspension formolbehandelter Blutkörperchen gemischt, die mit 2 Einheiten Hämolysin für jede globuläre Einheit sensibilisiert wurden (Technik s. oben). Die einzelnen Elemente wurden in folgendem Verhältnis benutzt: 0,25—0,5 ccm der zu 1:5 verdünnten Seren, 0,25—0,5 ccm des 1:20 verdünnten Bordetschen Antigens, 0,5—1,0 ccm einer 5proz. Blutkörperchensuspension, die vorher mit 2 Einheiten Hämolysin für jede globuläre Einheit sensibilisiert wurde, und die 2fache Komplementdosis im Verhältnis zur Blutkörperchensuspension.

Die Ergebnisse sind nicht bei allen Seren gleichmässig und hängen zweifellos von dem entsprechenden Gehalt an syphilitischem Ambozeptor ab. Trotzdem geht deutlich eine höhere Reaktionsfähigkeit der nicht erhitzten Seren daraus hervor, die sich in einer merklichen Beschleunigung der Komplementbindung ausdrückt. Diese Erscheinung hat nichts mit einer antihämolytischen Eigenschaft der Seren zu tun, die sich durch die entsprechenden Kontrol-

len ja leicht ausschliessen lässt, sondern lässt sich vielmehr höchstwahrscheinlich auf den gleichen Faktor zurückführen, der die kofixierenden Eigenschaften bei den nicht erhitzten Seren bedingt.

Weiterhin geht aus diesem Versuch hervor, dass durch Erhitzung diese Eigenschaft verschwindet. Bereits eine Erwärmung auf 50° während 30 Minuten verringert sie beträchtlich.

III. ÜBER UNSPEZIFISCHE REAKTIONSFAKTOREN.

Unspezifische Reaktionen zeigen sich in einem gewissen Prozentsatz bei allen Komplementbindungsreaktionen mit unerhitztem Serum und bilden die grösste Schwierigkeit bei deren Weiterentwicklung. Die Arbeiten von Noguchi, Sachs und Altmann beweisen, dass die Hitzeinaktivierung der Seren einen grossen Teil der unspezifischen Reaktionen beseitigt, so dass die Resultate der Komplementbindung in weit höherem Grade spezifisch werden. Friedemann führt die unspezifischen Reaktionen auf das labile Gleichgewicht der Globuline zurück, wodurch die antikomplementäre Wirkung zu erklären sei. Diese könnte durch eine Änderung der Globuline entstehen, wodurch dann schliesslich die Komplementfunktion völlig verschwinden könnte (Sachs).

Ausser diesen von der inneren Struktur der Seren abhängigen Faktoren gibt es noch andere von nicht geringerer Wichtigkeit bezüglich ihrer praktischen Bedeutung. Sie haben je nach der angewandten Methode einen verschiedenen Einfluss auf die Ergebnisse. Von diesen Faktoren seien der verschiedene Gehalt der Seren an hämolytischem System und Differenzen in der Reaktionsfähigkeit mit den gebräuchlichen Antigenen genannt. All diese Umstände erschweren die Untersuchung der aktiven Seren.

Unsere Methode, menschliches Serum von dem normalen hämolytischen System frei zu machen (Ambozeptor und Komplement) (1), gestattet, die nicht erhitzten Seren mit einem genau dosierbaren hämolytischen System zu untersuchen. Auf diese Weise wird ein grosser Teil schwer zu beurteilender Faktoren ausgeschaltet, der auf den verschiedenen Gehalt der Seren an hämolytischem System zurückzuführen ist, während man bei den hitzeinaktivierten Seren mit stets gleichbleibenden Mengen arbeitet.

Die auf die angegebene Weise ihres hämolytischen Systems beraubten nicht erhitzten menschlichen Seren besitzen einige Eigenschaften der aktiven Seren in ausgesprochenerem Masse, und zwar wegen des Fehlens des eigentlichen Kompensationssystems besonders bei den hämolytischen Reaktionen. Die Neigung zu unspezifischen Reaktionen tritt besonders deutlich hervor.

(1) Die Komplementabsorption ist eine begrenzte Reaktion; einige Seren können einen beträchtlichen Rest des Komplements bewahren, doch ist dies nur von teilweisem Einfluss auf die Versuchsergebnisse.

Meine Versuche berechtigen mich zu der Annahme, dass der Hauptgrund für die unspezifischen Reaktionen eine besondere Reaktionsfähigkeit der nicht erhitzten Seren ist, die in keiner Beziehung zu ihrer Eigenhemmung steht. Es gibt Seren ohne jegliche antikomplementäre Fähigkeit, die starke unspezifische Reaktionen geben, ebenso wie es demgegenüber Seren mit antikomplementären Eigenschaften oder Neigung hierzu gibt, die keine unspezifischen Reaktionen liefern.

Versuchsordnung

Es wurden einige Seren ausgewählt, unter denen sich auch solche mit unspezifischen Reaktionen befanden. Von jedem Serum wurde ein Teil in aktivem Zustande (1 ccm) im Eisschrank aufbewahrt, um die Entwicklung der antihämolytischen Fähigkeit zu untersuchen. Der Rest des Serums wurde in zwei Teile geteilt:

a) Ein Teil wurde nicht erhitzt, sondern in der angegebenen Weise mit formolbehandelten Blutkörperchen zur Zerstörung des hämolytischen Systems versetzt.

b) Ein Teil wurde durch Erwärmung auf 55° während 20 Minuten inaktiviert.

Mit jedem dieser Teile wurde in gewohnter Weise eine Wassermannsche Reaktion vorgenommen, und zwar wurde bei beiden das gleiche hämolytische System (Immunhämolysin und Meerschweinchenkomplement) benutzt: 0,25 bis 0,5 ccm im Verhältnis 1:5 verdünntes Serum, 0,25—0,5 ccm langsam auf 1:20 verdünntes Bordetsches Antigen, die doppelte Dosis Meerschweinchenkomplement und 0,5—1,0 ccm einer 5proz. Blutkörperchensuspension, die mit 2 Einheiten Hämolysin sensibilisiert war. Für den Nachweis antikomplementärer Eigenschaften wurden Kontrollröhrchen angesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug je nach der Dosis der einzelnen Elemente 1,0—1,5 ccm, die Bindungszeit 1 Stunde bei 37°, und die Dauer der Hämolyse 30 Minuten bei 37°.

Unspezifische Reaktionen liessen sich sowohl bei den aktiven wie bei den vorbehandelten aktiven Seren feststellen, indem bei den Antigen enthaltenden Röhrchen eine komplette Hemmung der Hämolyse und bei den Kontrollröhrchen eine komplette Hämolyse zu sehen war. In der Versuchsreihe mit erhitzten Seren fanden sich diese Reaktionen indessen nicht(1).

Nach diesen Versuchen wurde die Entwicklung des antikomplementären Verhaltens der im Eisschrank aufbewahrten Serumproben untersucht. Nach 2—3 und endlich nach 5—6 Tagen wurde eine Reaktion angesetzt und es zeigte sich, dass bei einigen Seren, deren Prozentsatz mit der Aufbewahrungsdauer zunimmt, eine starke antihämolytische Fähigkeit auftritt, die indessen keinerlei

(1) Die unspezifischen Reaktionen sind dadurch charakterisiert, dass sie im aktiven Serum nicht vorkommen und keinerlei Beziehungen zur Syphilis haben.

Beziehungen zu den vorher beobachteten unspezifischen Reaktionen aufweist.

So zeigte sich beispielsweise bei einem Versuch vom 11. Juni 1930 mit den 10 Seren N.^o 948—957 folgendes: Das Serum N.^o 949 reagierte unspezifisch mit völliger Hemmung der Hämolyse, ohne antikomplementäre Eigenschaften zur Zeit des Versuches. Die Seren N.^o 952 und 955 waren negativ. Bei der 48 Stunden später erfolgenden Nachuntersuchung zeigte das Serum N.^o 949 keine antihämolytischen Eigenschaften, die Seren 952 und 955 zeigten eine teilweise Hemmung der Hämolyse.

Bei einem weiteren Versuch vom 25. Juni 1930 mit den 10 Seren N.^o 994—1003 wiesen die Seren 999 und 1003 eine kräftige unspezifische Reaktion ohne antikomplementäre Eigenschaften auf. Nach Verlauf von 5 Tagen zeigten sich bei der Nachuntersuchung bei den Seren N.^o 999 und 1003 keinerlei antihämolytische Eigenschaften, dagegen bei den Seren N.^o 998—1000 und 1001 in starkem Ausmasse.

Ich komme nunmehr zur Darstellung einiger Faktoren, die das unspezifische Verhalten aktiver Sera zu beeinflussen vermögen.

Einfluss der Hitze

Wie bereits früher erwähnt, beschäftigen wir uns in dieser Arbeit ausschliesslich mit den Eigenschaften der nicht erhitzten Seren und deren unspezifischen Resultate, nicht indessen mit den erhitzten Seren. Es werden daher alle jene Seren, die auch im Zustande der Hitzeinaktivierung bei der Komplementbindung der Syphilisdiagnose unspezifische Resultate ergeben (Lepra, Malaria, usw.), hier nicht berücksichtigt.

Die Hitzeeinwirkung zeigt gewisse Besonderheiten, die hier näher geschildert werden sollen:

Eine Erwärmung auf 45° während 30 Minuten übt keinen merklichen Einfluss auf die von uns untersuchten Seren aus; allenfalls werden einige der unspezifischen Reaktionen etwas verstärkt. Bereits eine Erwärmung auf 47° hat einen merklichen Einfluss auf das Verschwinden der unspezifischer Reaktionen und lässt den Einfluss der Temperatur von 45° noch paradoxer erscheinen. Bei der Temperatur von 50° während 30 Minuten verschwinden einige der unspezifischen Reaktionen fast vollständig.

Versuch

- 1) 6 aktive menschliche Seren werden in 3 Teile geteilt:
 - a) nicht erhitzt,
 - b) auf 45° 30 Minuten lang unverdünnt erhitzt.
 - c) auf 50° 30 Minuten lang unverdünnt erhitzt.

Diese 3 Teile wurden mit dem gleichem Volumen einer 50proz. vorher sensibilisierten Suspension formolisierter Blutkörperchen behandelt, so dass die Seren im Verhältnis 1:2 verdünnt waren.

2) Langsam mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:20 verdünntes Antigen nach Bordet.

3) 0,5 ccm einer 5proz. sensibilisierten Blutkörperchensuspension.

4) 0,075 im Verhältnis 1:10 verdünntes Komplement.

Tabelle II.

	Nicht erhitze Seren		Auf 45° erhitze Seren		Auf 50° erhitze Seren	
Röhrchen N.º	1	2	3	5	4	6
Serum 1:2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigen 1:20	0,5	—	0,5	—	0,5	—
Komplement 1:10	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	—	0,5	—	0,5	—	0,5
1 Std. 37°. — Zusatz von 0,5 Blutkörperchensuspension. — AbleSEN nach 30 Minuten bei 37°						
Serum N.º						
1030	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k
1032	H ^p	H ^k	H ^p	H ^k	H ^k	H ^k
1034	H ^t	H ^k	H ^p	H ^k	H ^s	H ^k
1035	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k

Von den Seren reagiert N.º 1032 schwach und 1034 sehr stark in der unerhitzten Reihe. Die Reaktionen sind in der Reihe mit Erhitzung auf 45° verstärkt. In der Reihe mit Erhitzung auf 50° aber verschwindet die Reaktion des Serums 1032 bzw. wird beim Serum 1034 erheblich schwächer. Bei diesem Versuch findet sich also im nichterhitzten Serum nach der Behandlung mit den formolfixierten Blutkörperchen noch ein Rest von Komplement (unvollständige Absorption), nicht indessen mehr bei den beiden erhitzten Serumportionen.

Setzt man eine grosse Anzahl menschlicher Seren, die im aktiven Zustande mit einem Luesantigen unspezifische Reaktionen ergeben, der Erhitzung auf Temperaturen von 50—55° aus, so bemerkt man folgendes: Die Seren verhalten sich bei der gleichen Temperatur nicht alle gleichmässig, denn bei einigen Seren ist die Thermolabilität stärker ausgesprochen als bei anderen. Bildet man weiterhin aus den gleichen menschlichen Seren verschiedene Reihen — z. B. nicht erhitzt, auf 50° erhitzt und auf 55° erhitzt — und

stellt mit jeder die übliche Wassermannsche Reaktion mit nur einer Komplementdosis an, lässt binden und beobachtet nach Zusatz der Blutkörperchensuspension die allmähliche Entwicklung der Hämolyse, so tritt folgendes zu Tage: Die Seren, die in ihrem nicht erhitzten Anteil unspezifische Reaktionen ergeben, zeigen auch in ihren erhitzten Anteilen im ersten Moment der Hämolyse eine unspezifische Reaktion, und zwar in dem auf 50° erhitzten Anteil stärker als in dem auf 55° erhitzten Anteil. In dem Masse aber, in dem die Zeit der Hämolyse abläuft, schwinden die unspezifischen Reaktionen, schneller in der auf 55° erhitzten Serie als in der auf 50° erhitzten. Dieser Vorgang hat für mich eine grosse theoretische und praktische Bedeutung.

Die Fähigkeit der nicht erhitzten Seren, unspezifische Resultate zu geben, ist auf mindestens zwei Faktoren zurückzuführen: Der erste Faktor ist für sämtliche Seren von allgemeiner Bedeutung, und wird offenbar durch dieselbe Eigenschaft dargestellt, die wir als ko-fixierende Eigenschaft bezeichnet haben. Diese findet sich ebenso wie das Komplement und die antihämolytische Eigenschaft im labilen Substrat der Seren. Hierzu kommt in bestimmten Seren noch ein besonderer Faktor, der je nach dem Serum in verschiedenem Ausmasse in Gegenwart lipoidhaltiger Antigene Komplement inaktiviert, ebenso, wenn auch schwächer, wie die wirksamen Bestandteile der Luesseren. — Der thermolabile Teil würde nach unseren Darlegungen der ko-fixierenden Eigenschaft entsprechen.

Einfluss der Salze

Die Salzkonzentration hat einen sehr starken Einfluss auf die Komplementbindungsreaktion, insbesondere nach unseren Erfahrungen bei den unspezifischen Reaktionen. Die alkalischen Salze, wie die doppelkohlensauren und besonders die kohlensauren, haben eine ausgesprochenere Einwirkung als die neutralen Salze, wie beispielsweise das Kochsalz.

Versuch

Es gelangen zur Verwendung:

1) 9 aktive Seren, darunter 3 Luesseren (1 mit positiver Wassermann-Reaktion und 2 mit positiver Meinicke-Reaktion) und 6 nichtluetische Seren. Alle Seren sind zur Entziehung des normalen hämolytischen Systems mit formolfixierten Blutkörperchen behandelt.

2) Antigene.

a) Bordet 0,9 ccm plus 0,1 ccm 1proz. Cholesterinlösung. Mit physiologischer Kochsalzlösung schnell auf 1:20 verdünnt.

b) Bordet 1,0 ccm. Nach Verdampfen des Alkohols wird der Lipoidrückstand mit 20,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

c) Bordet, Verdünnung langsam mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:20.

3) Eine 0,5proz. Lösung von wasserfreiem Natriumkarbonat in physiologischer Kochsalzlösung.

Die zu untersuchenden Seren werden in zwei Hälften geteilt, die eine mit und die andere ohne Zusatz des Natriumkarbonats. Der Zusatz geschieht in der Menge von 0,1 ccm zu jedem Röhrchen.

Tabelle III.

Röhrchen N.º	Ohne Salzzusatz				Zusatz von 0,1 ccm 0,5proz. Karbonatlösung zu jedem Röhrchen		
	1	2	3	4	5	6	7
Serum 1:5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lösung des kohlen. Natrium	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1
Antigen a	0,5	—	—	—	0,5	—	—
" b	—	0,5	—	—	—	0,5	—
" c	—	—	0,5	—	—	—	0,5
Komplement	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—
1 Std. 37º. — Zusatz von 0,5 ccm einer 5proz. sensibilisierten Blutkörperchensuspension. Ablesen nach 30 Minuten 37º							
Serum N.º							
Lues 884	Hº	Hº	Hº	H ^k	H ^r	Hº	Hº
" 885	Hº	Hº	Hº	H ^k	Hº	Hº	Hº
" 886	Hº	Hº	Hº	H ^k	Hº	Hº	Hº
Nichtlues 887	Hº	Hº	Hº	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k
" 888	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k
" 889	Hº	Hº	Hº	H ^k	H ^{f.k.}	H ^{f.k.}	H ^{f.k.}
" 890	H ^k	Hº	Hº	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k
" 891	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k
" 892	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k	H ^k

Der Versuch demonstriert überzeugend, dass die unspezifischen Reaktionen der Seren N.º 887, 889 und 890 durch den Zusatz der geringen Menge von 0,1 ccm der Natriumkarbonatlösung vollständig verschwinden. Weiterhin aber beweist dieser Versuch den weiter unten noch näher zu besprechenden Einfluss der Antigene:

Dan schnell verdünnte Antigen a hat trotz des Cholesterinzusatzes eine nur geringe Bindungsfähigkeit.

Den gleichen Einfluss wie die Natriumkarbonatlösung hat eine Lösung von Kaliumbikarbonat, und zwar liegt für die oben geschilderten Versuchsbedingungen das Optimum bei einer 1proz. Lösung in physiologischer Kochsalzlösung. Die 0,5proz. Lösung hat einen noch merklichen Einfluss, die 2,5proz. Lösungen bedingen indessen eine gewisse Hämolysehemmung.

Die Neutralsalze, wie das Kochsalz, haben ebenfalls eine deutliche, wenn auch weniger starke Wirkung. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wäre hier eine Konzentration nötig, die etwa der vierfachen der isotonischen entspräche. Zweifellos ist daher für den Einfluss dieser Salze einerseits der Alkalitätsgrad, andererseits die Elektrolytenkonzentration massgebend.

Diese Versuchsergebnisse, insbesondere der Einfluss des Kochsalzes, haben eine besondere Bedeutung; sie sprechen dafür, dass man die Reaktion zu den Globulinreaktionen, und zwar besonders zu den Euglobulinreaktionen stellen muss. Handowsky und Wagner(1) bewiesen, dass die Lipoide des Pferde- und Hammelserums bei den homologen, durch Dialyse salzarm gemachten Seren starke Fällungen verursachten, die indessen durch Zusatz von Salzen zu verhindern sind. Gleiche Untersuchungen stammen von Jarisch(2) über cholesterinisierte Organextrakte. Es ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, dass alle diese als thermolabil beschriebenen Eigenschaften ihren Sitz oder mindestens eine sehr grosse Abhängigkeit von der Globulinfraktion des Serums, und zwar besonders von der wasserunlöslichen Euglobulinfraktion haben.

Der Einfluss der Antigene.

Für das Zustandekommen unspezifischer Reaktionen gibt es ausser den bereits geschilderten im Serum selbst beruhenden Faktoren noch andere von grosser Bedeutung, und zwar stellen den wichtigsten Faktor die Antigene dar. Sachs und Rondoni(3) wiesen den Einfluss der Art der Verdünnung der Antigene auf die Komplexbindung nach. Der gleiche Umstand spielt auch die Hauptrolle bei dem Einfluss der Antigene auf das Auftreten unspezifischer Reaktionen. Auch der Cholesterinzusatz ist offenbar über den physikalischen Zustand der Emulsionen wirksam.

Bei allen unseren Antigenversuchen diente das Antigen nach

(1) H. Handowsky und R. Wagner, Biochem. Zeitschr., Bd. 31, 1911.

(2) A. Jarisch, Pflüg. Arch., Bd. 194, 1922. Vgl. auch Mona Spiegel-Adolf, Die Globuline, 1930, S. 378 ff. — H. Thierfelder u. E. Klenk, Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide, 1930, S. 134—142.

(3) Vgl. J. Bordet, Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses, 1920, p. 437.

Bordet und Ruelens als Grundlage(1). Es handelt sich um einen alkoholischen Rinderherzextrakt mit vorheriger Azetonbehandlung. 1 ccm entspricht 0,5 frischem Organ. Dieser Extrakt verbindet mit seiner starken Wirksamkeit die Eigenschaft, in den gebräuchlichen Dosierungen keine merklichen antihämolytischen Wirkungen zu zeigen.

Mit diesem Extrakt wurden folgende Reihen von Emulsionen im gleichbleibenden Verdünnungsgrade von 1:20 angesetzt:

a) 1 ccm Extrakt. Schneller Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung zum Extrakt.

b) Bordetscher Extrakt mit 10 Proz. Zusatz einer 1 proz. Cholesterinlösung. Schneller Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung zum Extrakt.

c) 1 ccm Extrakt. Nach Verdampfen des Alkohols werden die Lipide in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

d) 1 ccm Extrakt. Kochsalzlösung wird dem Extrakt fraktioniert zugesetzt.

e) 1 ccm Extrakt. Der Zusatz der physiologischen Kochsalzlösung erfolgt langsam tropfenweise.

f) Extrakt Bordet mit 10 Proz. Zusatz einer 1proz. Cholesterinlösung. Der Zusatz der physiologischen Kochsalzlösung erfolgt langsam tropfenweise.

Diese verschiedenen Emulsionen gelangten bei der WaR. mit nicht erhitzten Seren zur Anwendung, und zwar besonders nach vorheriger Entziehung des hämolytischen Systems durch Zusatz formolfixierter Blutkörperchen. Hierbei beobachtet man, dass bei gleicher Dosierung und gleichen sonstigen Bedingungen die Zahl der unspezifischen Reaktionen von der Emulsion a zur Emulsion f hin ständig beträchtlich zunahm. Bei der cholesterinisierten Suspension b konnte man sogar den Cholesteringehalt oder die Konzentration verdoppeln, ohne dass die Ergebnisse beträchtlich abwichen.

Die Art der Verdünnung spielt somit in meiner Versuchsanordnung entsprechend den Resultaten von Sachs und Rondoni auch bei der Erzielung unspezifischer Resultate eine wesentliche Rolle. Eine besondere Erwähnung verdienen die cholesterinisierten Extrakte: die Vorteile einer grösseren Empfindlichkeit bei der Komplementbindung werden in diesen Versuchen durch eine Vermehrung der unspezifischen Reaktionen und durch ihr unregelmässiges Verhalten wieder aufgehoben. Die physikalischen Bedingungen der cholesterinisierten Emulsionen hängen streng von dem gegenseitigen Verhältnis der Phosphatide und des Cholesterins ab; es muss aus diesem Grunde bei der Herstellung derartiger cholesterinhaltiger Extrakte von dem genau bestimmten Phosphatgehalt der Organextrakte ausgegangen werden.

(1) Vgl. 1. c.

Ergebnisse.

Die unterhitzten menschlichen Sera besitzen eine ko-fixierende Fähigkeit bei der Bildung des Komplexes: syphilitischer Antikörper—Antigen—Komplement, ebenso, wie wir es für den hämolytischen Ambozeptor nachgewiesen haben. Diese Eigentümlichkeit zeigen sie in gleicher Weise gegenüber jenen Bestandteilen nicht-syphilitischer Seren, die mit lipoidhaltigen Antigenen (Phosphatiden) in Reaktion treten. Die grössere Reaktionsfähigkeit der unerhitzten Sera bei der Komplementbindung wird auch dadurch sichtbar, dass die positive Reaktion in einer überaus kurzen Zeit eintreten kann, wenn alle notwendigen Elemente gleichzeitig gemischt werden. Diese Eigenschaften sind im gleichen Masse thermolabil, wie wir es für die Ko-Fixierung des hämolytischen Ambozeptors, der antihämolytischen Eigenschaften und des Komplementes nachgewiesen haben. Dies dürfte dafür sprechen, dass alle diese Eigenschaften auf dem gleichen labilen biochemischen Substrat der Seren beruhen.

Diese ko-fixierende Eigenschaft der unerhitzten Seren findet sich wesentlich verstärkt, wenn die Seren vorher durch Behandlung mit formolfixierten Blutkörperchen ihres normalen hämolytischen Systems beraubt worden sind.

Im engsten Zusammenhange mit dieser Eigenschaft steht die grössere Zahl der unspezifischen Reaktionen bei den serodiagnostischen Methoden der Syphilis mit nicht erhitztem Serum.

Die unspezifischen Reaktionen sind nicht nur durch die Hitzeinaktivierung beeinflussbar; sie verschwinden auch bei Zusatz kleiner Mengen von Neutralsalzen (Kochsalz) und noch besser von Salzen mit schwach alkalischer Reaktion (Bikarbonate und Karbonate). Die Ambozeptorfunktionen, auf welche die unspezifischen Reaktionen zurückzuführen sind, treten häufig längere oder kürzere Zeit bei einigen akuten Prozessen (Scharlach, Gonorrhöe und einigen septischen Prozessen) auf. Sie können auch bei hitzeinaktivierten Seren zutage treten, wenn man den Verlauf der Hämolyse von Anfang an genau verfolgt. Bei einigen chronischen Infektionskrankheiten (Lepra usw.) können sie einen so hohen Grad erreichen, dass sie auch bei den hitzeinaktivierten Seren bei der gewöhnlichen Syphilisreaktion deutlich werden.

Die Natur der Antigene und die Art der Verdünnung bei der Herstellung der Emulsionen haben einen deutlichen Einfluss auf die unspezifischen Reaktionen.

Die antihämolytische Fähigkeit an sich hat keinen Einfluss auf das Auftreten unspezifischer Reaktionen. Beobachtet man indessen den Verlauf der Hämolyse vor Abschluss der gewöhnlichen Beo-

bachtungszeit, so erkennt man in der etwas verzögerten Hämolyse das Vorhandensein einer gewissen unspezifischen Reaktion.

Bei den serodiagnostischen Methoden der Syphilis mit teilweise erhitzten Seren (Hohn u. a.) ist die Möglichkeit des Auftretens unspezifischer Reaktionen grösser als bei Verwendung der in gewöhnlicher Weise inaktivierten Seren, da hier die für das aktive Serum beschriebenen Eigenschaften teilweise noch erhalten sind. Ein jeder Fehler im hämolytischen System oder in den Antigenen (bei der Beladung cholesterinierter Antigene) kann die Zahl der unspezifischen Reaktionen ansteigen lassen.