

[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin
(Direktor: Geheimer Obermedizinalrat Dr. Gaffky)
und
der Königl. dermatologischen Universitätsklinik in Breslau.]
(Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Neisser.)

Weitere Mitteilungen über den Nachweis spezifisch-luetischer Substanzen durch Komplementverankerung.

Von

A. Wassermann, A. Neisser, C. Bruck und A. Schucht.

In Nr. 16 der „Deutschen med. Wochenschrift“, 1906 haben die einen von uns (Wassermann, Neisser und Bruck) die Mitteilung gemacht, daß es mit Hilfe einer auf dem Prinzip der Bordetschen Komplementbindung beruhenden Methodik gelingt, im Serum von mit syphilitischem Material vorbehandelten Affen spezifische Antikörper gegen luetische Substanzen und zweitens, mit Hilfe dieser Immunseren in syphilitischen Produkten spezifische Luesstoffe (Antigene) nachzuweisen. Unsere damalige kurze Angabe hat bisher für Lues nur von Detre¹ Bestätigung gefunden, eine weitere Nachprüfung ist bisher indessen noch nicht erfolgt. — Der Zweck der vorliegenden Arbeit ist der, in ausführlicher Weise die Protokolle über das große Versuchsmaterial, auf Grund dessen wir die obigen Sätze festgestellt haben, zu publizieren.

Wir haben, wie schon erwähnt, unsere ersten überzeugenden Resultate des Nachweises spezifisch luetischer Substanzen (Antigene) in syphilitischen Produkten ausschließlich mit Serum von spezifisch vorbehandelten Affen erhalten. — Zwecks Vorbehandlung zur Gewinnung des Serums wurden in den Versuch gezogen:

¹ *Wiener klin. Wochenschrift.* 1906.

Chimpansen, Meerkatzen, *Macacus rhesus*, *cynomolgus*, Paviane. Im ganzen wurden behandelt: 41 Affen, davon erhielten:

1. menschliches Material:

- a) Condylom- und Primäraffektaufschwemmungen: 3.
- b) Blut, frisch, von menschlicher Lues II: 10.
- c) Extrakt hered.luet. Föten: 12.
- d) Blutextrakt aus Blut von Lues II: 6.

2. Affenmaterial:

- a) Organemulsionluetischer Affen: 6.
- b) Frisches Blutluet. Affen: 4.

Im einzelnen können wir nach der Art der Vorbehandlung also 5 Reihen unterscheiden:

Die erste Reihe erhielt in Abständen von ca. 7 bis 8 Tagen subkutan steigende Mengen (bis 20^{cem}) durch Hirudin flüssig gehaltenes menschliches Blut von Patienten der Sekundärperiode der Syphilis.

Die zweite Reihe bekam in demselben Zeitraume frische zerkleinerte Condylom-, Primäraffekt- und primäre Bubonenaufschwemmungen in physiologischer Kochsalzlösung subkutan. — Reihe 1 und 2 wurde demnach mit lebendem vollvirulentem Material vorbehandelt, soweit man das überhaupt aus unsern sonstigen Kenntnissen über das Vorhandensein von virulentem Virus in menschlichem Material schließen darf.

Reihe 3 erhielt Extrakte aus sekundärsyphilitischem Blut, gewonnen durch 24 stündiges Schütteln der auscentrifugierten Blutkörperchen in 0.5 Prozent karbolhaltiger physiologischer NaCl-Lösung.

Reihe 4 bekam Extrakt aus den zerkleinerten und gut zerriebenen Organen (Leber, Milz, Niere, Hoden, Knochenmark) menschlicher sicher hereditärluetischer Föten und Kinder.

Reihe 3 und 4 wurde also mit abgetötetem Material vorbehandelt.

Reihe 5 endlich erhielt Extrakt der Organe syphilitisch infizierter Affen. Diese Reihe wurde also nicht mit menschlichem, sondern mit homologem Affenmaterial vorbehandelt.

Jede dieser fünf Reihen zerfällt nun wieder in zwei Unterabteilungen, indem

- a) bereitsluetisch infizierte Affen nach Ablauf des Primäraffektes, und
- b) gesunde, nicht infizierte Affen mit dem genannten Material vorbehandelt wurden.

Zur Illustrierung fügen wir einige Versuchsprotokolle als Beispiele bei:

I. Immunisierung einesluetischen Affen mit virulentem menschlichem Material.

Affe I (Mac. nemestrinus).

- | | | | | | |
|----------|----|---|---|---------------------|---|
| 9. XI. | 05 | infiziert. | | | |
| 19. XII. | 05 | Primäraffekt. | | | |
| 24. I. | 06 | Aufschwemmung einer frischen hered.luet. Nebenniere subkut. | | | |
| 8. II. | 06 | " | " | primären Lymphdrüse | " |
| 21. II. | 06 | " | " | " | " |
| 12. III. | 06 | " | " | " | " |
| 21. III. | 06 | Blutentnahme. | " | " | " |

II. Immunisierung einesluet. Affen mit Extrakt der Organe von hered.luet. Föten in Karbolkoehsalzlösung.

Affe LVI (Cynoceph. lab.).

- | | | | | | |
|---------|----|-------------------------|-------------------|-----------|---|
| 9. III. | 06 | infiziert. | | | |
| 4. IV. | 06 | Primäraffekt. | | | |
| 6. IV. | 06 | hered.luet. Extrakt III | 10 ^{cem} | subkutan. | |
| 14. IV. | 06 | " | " | IV 10 | " |
| 21. IV. | 06 | " | " | VI 10 | " |

III. Immunisierung eines gesunden Affen mit frischem Blut sekundärluet. Menschen.

Affe CXIV (Cercopith. fulig.).

- | | | | |
|---------|-----|-------------------|-----------------------------------|
| 9. VI. | 06. | 10 ^{cem} | Blut von Lues II frisch subkutan. |
| 14. VI. | 06. | 10 | " " " " " " |
| 21. VI. | 06. | 10 | " " " " " " |
- usw.

Nach 4 bis 5 maligen (wenn nötig, auch häufigeren) Injektionen wurde von den Tieren Serum gewonnen, dieses bei 56° inaktiviert und nun mit folgenden „Antigenen“ geprüft:

1. Extrakte von Primäraffekten.¹
2. Extrakte von Condylomata lata,
3. Extrakte von hereditär-syphilitischen Föten und Kindern.
4. Extrakte von Organen syphilitisch infizierter Affen.

¹ Diese und alle in der Arbeit erwähnten Extrakte werden folgendermaßen hergestellt: 24 stündiges Schütteln der zerkleinerten Organteile mit 0.5 Prozent karbolhaltiger physiologischer NaCl-Lösung (auf 1^{gramm} Organ ca. 4^{cem} Flüssigkeit). Nach 24 Stunden wird sofort zentrifugiert und die klare Flüssigkeit dekantiert.

Wir verwandten zur Untersuchung in der Regel 1^{cem} des Immunserrums 1:10, fügten 1^{cem} des zu untersuchenden Antigen 1:10 und 1^{cem} frisches normales Meerschweinchenserum 1:10 zu, ließen die Mischung 1 Stunde binden, dann wurde die 2 mal komplett lösende Dose eines Kaninchen-Hammelblutambozeptors sowie 1^{cem} 5 prozentigen gewaschenen Hammelblutes zugefügt; darauf wieder 2 Stunden Brutschrank und Ablesung des Resultates.¹

Hemmung oder Ausbleiben der Hämolyse beweist auf Grund der Arbeiten von Bordet und Gengou, welche das Phänomen der Komplementbindung zuerst für den Nachweis von Ambozeptoren verwendeten, sowie der späteren Untersuchungen von Moreschi, M. Neisser und Sachs nach den in den früheren Arbeiten² ausführlich besprochenen Prinzipien und unter Innehalten der notwendigen Kontrollen die gleichzeitige Gegenwart spezifischen Antikörpers und spezifischen Antigens: in unserem Falle also Luesimmunkörpers und Luesstoffe.

Für jeden mit dem Wesen der Komplementbindung vertrauten Untersucher mußte es von vornherein klar sein, wie wir das auch bereits in unserer ersten Mitteilung zum Ausdruck brachten, daß bei der Vorbehandlung von Affen mit menschlichem Eiweißmaterial und der Vermischung solchen Serums mit Extrakt aus menschlichenluetischen Produkten nach den Arbeiten von Uhlenhuth die Möglichkeit des Eintritts von Eiweißpräzipitinen vorlag. Da nun bei der Bildung von Eiweißpräzipitinen Komplementbindung eintritt (Gengou, Gay, Moreschi, M. Neisser und Sachs), so mußte es unser erstes Bestreben sein, festzustellen, daß beim Mischen des Affenserums aus den Reihen 1, 2, 3, 4 mit menschlichemluetischem Material die Komplementbindung nicht eine Folge einfacher Eiweißpräzipitierung, sondern des Zusammentreffens spezifischluetischer Antisubstanzen und Antigene war. Dies wurde in der Art festgestellt, daß jedes derartige Serum, bevor es in den Versuch genommen wurde, sowie auch in jedem einzelnen Versuche zur Kontrolle mit entsprechendem menschlichem Material, das von sicher nichtluetischen Individuen herrührte, vermischt wurde. In dieser Kontrolle durfte eine Komplementbindung, d. h. Hämolysehemmung nicht eintreten. Aus der beifolgenden Tabelle sind einige derartige Versuche zu ersehen. (Vgl. folg. Tabelle.)

¹ S. auch Wassermann u. Bruck, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1906. Nr. 12.

² Dieselben, *Med. Klinik*. 1905. Nr. 55. — *Deutsche med. Wochenschrift*. 1906. Nr. 12.

Datum des Versuches	Affe Nr.	Vor-behandelt mit	0.1 Serum geprüft an luetischem menschlichem Material	Resultat	0.1 Serum geprüft an nicht luet. menschlichem Material	Resultat
25. III. 1906	1	menschl. prim. Bubonen	0.1 cem hered. Fötalextrakt II	Hemmung der Hämolysen	0.1 cem normaler Kinderextrakt I	komplette Lösung
	0.1 cem normales Affenserum	—	desgl.	komplette Lösung		
	—	—	desgl. allein ohne Immunserum	"		
	0.1 Serum 1 allein ohne Antigen	—	—	"		
5. VI. 1906	17	Blut von sekund. Luetikern	0.1 cem hered. luet. Kinderextrakt VIII	Hemmung der Hämolysen	0.1 cem norm. Kinderextrakt 58	komplette Lösung
	0.1 cem normales Affenserum	—	desgl.	komplette Lösung		
	—	—	desgl. allein ohne Immunserum	"		
	0.1 Ser. 17 allein ohne Antigen	—	—	"		
28. III. 1906	30	hered. luet. Kinderextrakt	0.1 cem hered. luetischer Kinderextrakt 26	Hemmung der Hämolysen	0.1 cem norm. Kinderextrakt II	komplette Lösung
	0.1 cem normales Affenserum	—	desgl.	komplette Lösung		
	—	—	desgl. allein ohne Immunserum	"		
	0.1 Ser. 30 allein ohne Antigen	—	—	"		
13. IX. 1906	113	Extrakte a. Blut v. sek. Luetikern	0.1 cem hered. luetischer Extrakt 556	Hemmung der Hämolysen	0.1 cem norm. menschlicher Extrakt 453	komplette Lösung
	0.1 cem normales Affenserum	—	desgl.	komplette Lösung		
	—	—	desgl. allein ohne Immunserum	"		
	0.1 Ser. 113 allein ohne Antigen	—	—	"		

Wie nötig die von Anbeginn an von uns eingehaltene Kontrolle mit dem normalen betr. Eiweiß ist, geht daraus hervor, daß mit zunehmender Zahl der Injektionen im Einklang mit den Uhlenhuthschen Untersuchungen im Serum einer großen Anzahl Affen Eiweißpräzipitine für normales menschliches Eiweiß auftreten. Derartiges Serum ist natürlich für die Reaktion auf luetische Substanzen nicht mehr zu benutzen. Am häufigsten treten die Präzipitine für normales menschliches Material auf, je reicher an Eiweißgehalt das zur Vorbehandlung der Affen verwendete Material ist.

Beifolgende Tabelle zeigt ein solches Vorkommnis:

Affe LIV (Cercopith. fulg.).

9. III. 06 infiziert.

1. IV. 06 Primäraffekt.

5. IV. bis 28. IV. 06 vier Injektionen à 10^{cem} Lues II Blut subkutan.

5. V. 1906. Serum 0.1 ^{cem} . Geprüft gegen	Resultat
0.05 hered. luet. Extr. V	Hemmung
0.1 Extrakt eines tubero-serpiginösen Syphilids . .	"
0.1 hered. luet. Extr. VI	"
0.1 luet. Placentarextrakt VI	"
0.2 Kondylomextrakt	"
0.1 hered. luet. Extr. IV	"
0.05 hered. Extr. III	"
0.1 nicht luetischer Organextrakt III	komplette Lösung
0.1 " " " 62	" "
0.1 " " " 66	" "
0.1 " " " 63	" "
0.1 Organextr. luet. infizierter Affen Nr. 31 . . .	Hemmung
0.1 " " " " Nr. 33	"

6. V. bis 21. V. 06 wieder vier Injekt. à 10^{cem} Lues II Blut subkutan.

5. VI. geprüft, verhält sich wie oben.

6. VI. und 11. VI. wieder zwei Injektionen à 10^{cem} Blut subkutan.

Nach diesen Injektionen ergibt nunmehr 0.1^{cem} Serum dieses Affen mit jedem menschlichen (auch nichtluetischem) Materiale Hämolysehemmung. — Es sind also nunmehr im Serum des Tieres Präzipitine für menschliches Eiweiß aufgetreten (Uhlenhuth). Das Serum ist für unsere Zwecke nicht mehr brauchbar.

Aus der vorliegenden Tabelle ersehen wir somit, daß das Serum eines vorbehandelten Affen anfänglich keine Reaktion mit normalem menschlichem Eiweiß, sondern nur mit luetischem gab, daß aber mit der weiteren Behandlung das Serum präzipitierende Eigenschaften und damit auch die Reaktion für normales menschliches Eiweiß gewann.

Ziehen wir die Schlußfolgerung aus dem bisher Gesagten, so geht daraus hervor, daß als erste Kontrolle bei allen Seris, die von

Affen mittels Injektionen von menschlichem luetischem Material gewonnen werden, durch stete Kontrolle in jedem Einzelversuch festgestellt werden muß, ob ausschließlich luetisches und nicht auch das entsprechende Körpergewebe nicht luetischer Menschen die Reaktion gibt.

Indessen schienen uns auch diese Versuche noch nicht genügend, um auf Grund derselben die obengenannten Sätze aufzustellen, und wir haben deshalb Versuche angestellt, bei denen die Mitwirkung normaler Eiweißpräzipitine von vornherein ausgeschlossen war. Dies konnte nur in der Weise geschehen, daß bei der Vorbehandlung der Affen nur homologe Eiweißarten verwendet wurden. Zu diesem Behufe haben wir Affen mit Material vorbehandelt, das von luetischen Affen herstammte, und haben das Serum dieser Affen wiederum gegen luetisches und normales Material von Affe und Mensch geprüft.

Ein Beispiel dieser Versuche zeigt die folgende Tabelle:

Affe 31 (Cynoceph. bab.).

22. I. bis 22. III. 06. Sechs Injektionen mit Knochenmarkextrakt von Affen ca. 7 Wochen nach positiver Impfung.

0.1 ccm Serum 31 geprüft gegen	Resultat
0.1 luet. Kinderextrakt	Hemmung der Hämolyse
0.1 luet. Affenorganextrakt	„ „
0.1 normaler menschlicher Kinderextrakt . . .	komplette Lösung
0.1 normaler Affenorganextrakt	„ „
0.1 norm. Affenserum + 0.1 luet. Kinderextrakt	„ „
0.1 norm. Affenserum + 0.1 luet. Affenorganextrakt	„ „

Alle Kontrollen wie üblich.

Wie aus der vorstehenden Tabelle hervorgeht, tritt auch hier die spezifische Reaktion nur mit luetischem und nicht mit normalem Material ein, also unter Verhältnissen, unter denen das Vorhandensein von Eiweißpräzipitinen überhaupt ausgeschlossen ist.

Wenden wir uns nun nach diesen prinzipiellen Feststellungen zu den Einzelheiten der Methode, so müssen wir vor allem dessen eingedenk bleiben, daß wir aus dem Verschwinden freien Komplementes und der daraus resultierenden Hemmung der Hämolyse eine Diagnose stellen wollen. Die Diagnose ist aber nur alsdann richtig, wenn das Verschwinden des Komplementes durch den Zusammentritt von spezifischem Antigen und dementsprechendem Antikörper erfolgt. Jeder andere unentdeckt bleibende Einfluß, welcher das freie Komplement verdeckt und dessen Wirkung verhindert (Adsorption, Zerstörung usw.), kann demgemäß eine Fehlerquelle

sein. Hierzu kommt, daß die Aviditätsverhältnisse des Komplements zu dem als Indikator dienenden hämolytischen Ambozeptor schwankend und von der wechselnden Stärke und Beschaffenheit des letzteren abhängig sind.

In der Tat haben uns unsere zahlreichen Einzelversuche gelehrt, daß die Zahl der Fehlerquellen bei Anstellung der Reaktion eine sehr große sein kann. In dieser Beziehung möchten wir an die Spitze die schon in den ersten Mitteilungen von Wassermann und Bruck¹ festgestellte Tatsache stellen, daß sehr viele Extrakte und Seren in gewissen Mengen für sich allein Komplement binden. Die Dosen, in welchen dies geschieht, sind nach unseren Erfahrungen für die einzelnen Seren und Extrakte sehr verschieden und wechseln bei ein und demselben Serum und Extrakt mit der Zeit insofern, als beispielsweise ein Serum oder Extrakt, welche früher in bestimmter Menge, z. B. 0.1 (1^{cem} einer Verdünnung 1:10) beim Zusatz zum hämolytischen System ohne Antikörper nicht hemmten, nun hemmen. Es können also in organischen Flüssigkeiten und Extrakten durch Umlagerungen Veränderungen vor sich gehen, so daß diese Flüssigkeiten für sich allein schon in kleinen Dosen Komplement adsorbieren und damit die Hämolyse hemmen.

Worauf dies beruht, ist uns noch nicht in allen Punkten klar geworden. — In dieser Beziehung ist es von Wichtigkeit zu wissen, daß alle, selbst geringsten Niederschläge und Trübungen in dem Extrakte oder Serum Komplement adsorbieren können. Das ist eine ja bereits durch Ehrlichs, Morgenroths, v. Dungerns und Wildes Untersuchungen bekannte Tatsache. Diese Forscher zeigten nämlich, daß Organbreie und Emulsionen von getrockneten Hefezellen Komplemente binden. — Demgemäß wirkt von vornherein jeder Extrakt und jedes Serum für sich allein komplementbindend, und ist daher unbrauchbar, wenn sich in der Flüssigkeit geringste Mengen von Eiweißniederschlägen zeigen oder bilden. Sehr häufig kann man in solchen Fällen diese Störung noch dadurch beseitigen, daß man die Flüssigkeit vor dem Versuch nochmals zentrifugiert, wie überhaupt das Arbeiten mit stets bis zur völligen Klarheit und zwar möglichst kurz vor dem Versuch zentrifugierten Flüssigkeiten erforderlich ist. Man muß indessen dabei immer eingedenk bleiben, daß mit jedem erneuten Ausfällen von Eiweißsubstanzen und Entfernung derselben durch Zentrifugieren auch ein Verlust an spezifischem Material (Antigen und Antikörpern) einhergeht. — Aus dem Gesagten ergibt sich weiterhin für die Anwendung bei anderen Infektionskrankheiten, daß die Arbeitsmethode nach Wassermann und Bruck ausschließlich nur für die Verwendung von klar gelösten Extrakten, wie es diese Autoren stets vor-

¹ Wassermann und Bruck, *Med. Klinik*. 1905. — *Deutsche med. Wochenschrift*. 1906. Nr. 12.

geschrieben hatten, nicht aber für Bakteriensuspensionen, wie diese Bordet zuerst für die Komplementbindung anwendete, gilt.

Indessen kommen auch Komplementadsorption und Hämolysehemmung seitens der Seren und Extrakte allein vor, ohne daß derartige Niederschläge als Ursache dafür anzuschuldigen wären, indem die betreffenden Flüssigkeiten völlig klar sind und bleiben und daher auch die Zentrifugierung unter diesen Umständen die Hemmung nicht beseitigen kann. Ganz besonders oft sieht man dies bei solchen Seris und Extrakten, die nach der Herstellung noch längere Zeit stehen geblieben waren, ehe sie klar abzentrifugiert wurden. Bei Seris kommt noch hinzu, daß sie möglichst bald nach der Absetzung bei 56° inaktiviert werden müssen.

Organextrakt 27.

24. III. 06 0·1 Extrakt + 0·08 Meerschweinchenkomplement + hämolyt. System: komplette Lösung.

25. III. 06 dasselbe.

30. III. 06 dasselbe.

4. IV. 06 0·1 Extrakt + 0·1 Komplement + hämolyt. System: Kuppe.

7. IV. 06 0·1 Extrakt + 0·1 Komplement + hämolyt. System: völlige Hemmung. (Extrakt dauernd klar.)

Aus dieser Tabelle ersehen wir, daß ein Extrakt, der zuerst in der Menge von 0·1 für sich allein nicht hemmte, mit der Zeit stark komplementadsorbierende Eigenschaften gewann. In diesen Fällen hatten wir den Eindruck, daß die Steigerung der komplementbindenden Wirkung der Extrakte auf fermentativen bzw. autolytischen Prozessen beruht, indem mit der Zeit Stoffe vermehrt in Lösung gehen, welche komplementbindende Eigenschaften haben. In dieser Beziehung sind die Arbeiten von Wassermann und Citron geeignet, uns Verständnis für dieses Phänomen zu bringen, da diese Autoren zeigten, daß bereits geringe Mengen der meisten Nährstoffe, also Albumosen, Glycogen, und besonders auch fettartige Substanzen, Lecithin, schon in geringen Mengen Komplement binden und so die Hämolyse behindern. Damit stimmt völlig überein die graduelle Verschiedenheit der Komplementbindung, welche verschiedene Extrakte und Körperflüssigkeiten an und für sich zeigen. Im allgemeinen läßt sich sagen, je ärmer eine Flüssigkeit an Eiweiß und fettähnlichen oder, allgemeiner gesagt, kolloidalen Substanzen ist, desto geringer ist ihr Komplementbindungsvermögen für sich allein. Nach unseren Untersuchungen ist in dieser Hinsicht die günstigste Flüssigkeit die Spinalflüssigkeit des Menschen. Am ungünstigsten verhält sich ein Extrakt aus roten Blutkörperchen, in welchem entsprechend der Fragilität und komplexen Zusammensetzung dieser Zellen ungemein verschiedene Eiweiß- und daneben noch fettähnliche Körper (Lecithin, Cholestearin usw.) enthalten sind.

In der Mitte stehen die Extrakte aus anderen Organen, die bald mehr, bald weniger stark diese Hemmung zeigen. So gehört es zu den größten Seltenheiten, daß eine Lumbalflüssigkeit in der Menge von 0.2 für sich allein hemmt, während dies bei älteren Blutkörperchenextrakten relativ häufig vorkommt. Frisch bereitete Extrakte hemmen meist in der Dosis von 0.5 noch nicht, beim Älterwerden tritt zuweilen schon eine Hemmung bei 0.1 auf. Alle Körperflüssigkeiten und Extrakte aber und voraussichtlich alle kolloidale Moleküle enthaltenden Flüssigkeiten haben, was nach dem bisher Auseinandergesetzten leicht verständlich ist, eine obere Grenze, bei der die Hemmung der Hämolyse durch sie allein bewirkt wird, wenn eben so viel zugesetzt wird, daß die in ihnen enthaltenen Stoffe ausreichen, um das Komplement zu adsorbieren. Diese Hemmungen haben aber mit dem Gehalt der betreffenden Extrakte an spezifischen Infektionssubstanzen nichts zu tun, wie am klarsten daraus hervorgeht, daß die allein hemmende Dosis des Organextraktes eines luetischen oder nicht luetischen Individuums keine Unterschiede zeigt. Fassen wir somit die aus diesem Abschnitte für die praktische Verwendung der Extrakte und Seren sich ergebenden Folgerungen zusammen, so sind das folgende: Seren und Extrakte können bei der vorliegenden Methode für den Ungeübten dadurch zu einer Fehlerquelle werden, daß sie in einer gewissen Menge für sich allein Komplement binden und so die Hämolyse behindern. Um diese Fehlerquelle zu entdecken und ihr zu entgehen, ist es in jedem Versuche nötig, sich davon zu überzeugen, in welcher Quantität das betreffende Serum und der Extrakt für sich allein die Hämolyse hemmt. Bei der Anstellung des Versuches muß dann stets eine solche Dosis gewählt werden, welche allein die komplette Lösung in keiner Weise stört. Ist die Verdünnung eines Extraktes nicht unterhalb dieser Grenze durchzuführen, indem bei einer Verdünnung, bei welcher die Absorption durch den Extrakt allein ausbleibt, auch die in dem Extrakt enthaltenen spezifischen Substanzen schon derart verdünnt sind, daß die spezifische Reaktion nicht mehr eintritt, dann ist die betreffende Flüssigkeit für die Anstellung der Reaktion überhaupt nicht zu gebrauchen. Die Nebenhemmungen seitens der Extrakte und Seren für sich allein werden am besten vermieden: 1. bei Seren durch klare Zentrifugierung und durch sofortiges Inaktivieren nach der Gewinnung; 2. bei Extrakten dadurch, daß sie nach Fertigstellung (Schütteln) sofort von den Zellen getrennt werden; 3. durch absolut sterile Aufbewahrung in völlig gefüllten, wo möglich zugeschmolzenen Glasgefäßen bei konstanter am besten Gefrier-Temperatur und vor Licht und Luft geschützt; 4. bei jeder nachträglich sich im Extrakt oder Serum bildenden Ausfällung oder Trübung von Eiweißsubstanzen muß die Flüssigkeit wieder

klar zentrifugiert werden, indessen sinkt natürlich bei jeder derartigen Manipulation auch der Gehalt an spezifischen Substanzen (Antigen bzw. Antikörper). Demzufolge ist das Arbeiten mit länger konservierten Flüssigkeiten schwieriger und findet nach einiger Zeit seine Grenze, während die Anwendung möglichst frisch bereiteter Reagentien besonders für den noch nicht ganz Geübten die klarsten Resultate ergibt; 5. in jedem einzelnen Versuche ist die Dosis des Extraktes bzw. Serums zu bestimmen, welche für sich allein die Hämolyse hemmt.

Nachdem wir im vorhergehenden die Fehlerquellen berücksichtigt und auseinandergesetzt haben, die bei der Anstellung der Reaktion unseren Erfahrungen nach seitens des Extraktes und des spezifischen Serums in Frage kommen, hätten wir uns nunmehr mit den anderen zur Ausführung der Reaktion nötigen Komponenten und ihren möglichen Fehlerquellen zu beschäftigen. Bekanntlich benützt man seit der ersten Arbeit Bordets und Gengous über das Phänomen der Komplementbindung als Indikator für den Eintritt oder Nichteintritt der Reaktion das Ausbleiben der Auflösung von roten Blutkörperchen. Diese Auflösung vollzieht sich durch die kombinierte Wirkung eines hämolytischen Ambozeptors und des dazu gehörigen Komplements. Komplement und hämolytischer Ambozeptor müssen dabei in einem bestimmten Aviditätsverhältnisse stehen, und diese Avidität hängt, wie wir wissen, neben anderen Ursachen besonders von den Mengenverhältnissen ab, in denen sich hämolytischer Ambozeptor und Komplement zueinander befinden. Daraus geht hervor, daß es nötig ist, mit einem absolut genau austitrierten hämolytischen System zu arbeiten. Unsere diesbezüglichen zahlreichen Versuche haben ergeben, daß das geeignetste hämolytische System ein solches ist, das durch Vorbehandlung von Kaninchen mit gewaschenen roten Blutkörperchen von Hammeln erzielt wird, und welches zuerst von M. Neisser und Sachs verwendet wurde.

Das hämolytische Serum ist am besten so stark, daß es in der Verdünnung von 1:1000 bis 1:2000 bei Zusatz von 0.1 frischen Meerschweinchenserums als Komplement 1^{cem} einer 5prozentigen gewaschenen Hammelblutlösung völlig nach 2 Stunden bei 37° löst. Zur Anstellung des Versuches haben wir stets eine gleichbleibende Menge hämolytischen Ambozeptors d. h. die zweifach lösende Dose, also bei einem Titer des Serums von 0.001 die Dose von 0.002 für 0.1 Meerschweinchenkomplement verwendet. Selbstredend muß der hämolytische Ambozeptor bei 56° inaktiviert werden.¹

¹ Dabei muß bemerkt werden, daß die auf Luesantikörper zu prüfenden Menschen- und Affenserum schon an und für sich, wie jedes normale Menschen- oder Affenserum einen spezifischen Ambozeptor gegen Hammelblut enthalten, der in den meisten Fällen so stark ist, daß 0.1 Affen- und Menschenserum schon zur völligen Lösung von 1^{cem}

Auch für diese Reagentien gilt nun das Gleiche wie das oben von Extrakten und spezifischem Luesserum Auseinandergesetzte, nämlich, daß sie bei längerer Aufbewahrung nicht konstant ihre ursprüngliche Wirksamkeit beibehalten. Der hämolytische Ambozeptor schwächt sich mit der Zeit ab, und dieses Vorkommnis hat, wenn man es nicht bemerkt, zur Folge, daß die Avidität zum Komplement zu gering wird. Unter Umständen kann dann die Lösung der roten Blutkörperchen ausbleiben, obwohl das Komplement bei der vorherigen Zusammenmischung von Immunserum mit seinem Gegenstoff nicht verankert war. Es ist deshalb durchaus nötig, von Zeit zu Zeit sich durch erneute Austitrierung des hämolytischen Ambozeptors zu vergewissern, welches die richtig zu wählende Dose ist. Zeigt es sich dabei, daß die Abschwächung oder die aus anderen Gründen erfolgte Aviditätsänderung zum Komplement eine beträchtliche ist, so ist dieser hämolytische Ambozeptor nicht weiter zu verwenden, sondern ein neuer in den Versuch zu ziehen, indem sich in solchen abgeschwächten oder umgelagerten Ambozeptoren direkte Hemmungssubstanzen bilden. Der Geübte kann in manchen Fällen diese Fehlerquelle noch vermeiden, indem er nach dem Vorgange von Bordet-Gengou nicht getrennt Ambozeptor und rote Blutkörperchen zusetzt, sondern die roten Blutkörperchen vorher mit Ambozeptor „sensibilisierte“. Indessen empfehlen wir diese Methode für denjenigen, der ein Neuling in diesen Sachen ist, nicht, sondern, wie schon erwähnt, die Verwendung möglichst frischen und in der obigen Weise genau austitrierten hämolytischen Serums.

Was das Komplement selbst angeht, so muß dasselbe stets frisches, klarst zentrifugiertes, von Hämoglobinbeimengungen freies Meerschweinchen-serum sein, das an dem Versuchstage selbst frisch gewonnen wird. Die zu den Versuchen zu verwendenden roten Blutkörperchen stammen nach unserer Erfahrung am besten vom Hammel, dieselben müssen dadurch, daß das defibrierte Blut zentrifugiert und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wird, von jeder Spur anhaftenden Serums befreit werden. Sie werden alsdann in einer 0.85 prozentigen NaCl-Lösung zu 5 Prozent suspendiert. Eine Fehlerquelle kann hierbei dadurch eintreten, wenn bei fortgesetzten Blutentziehungen bei ein und demselben Tiere die roten Blutkörperchen zu fragil werden und in ihrer Struktur leiden. Wir sahen diesen Fall einmal eintreten, wie aus folgendem Protokoll hervorgeht:

5 prozent. Hammelblut ausreicht. Es empfiehlt sich — wenigstens nach unseren bisherigen Untersuchungen — aber nicht, sich auf diesen Gehalt an normalen Hammelblutambozeptoren, der doch größeren Schwankungen unterworfen sein kann, zu verlassen, sondern man muß sich stets eines immunisatorisch erzeugten Hammelblutambozeptors, wie oben beschrieben, bedienen.

Einem Hammel wurden mehrere Wochen hindurch beinahe täglich Aderlässe à ca. 5^{cem} gemacht.

Am 25. III. wird das Blut dieses Hammels zur Austitrierung eines hämolytischen Ambozeptors benutzt und als Titer 0.001 festgestellt. Mit diesem hämolytischen Ambozeptor und Hammelblut wird eine spezifische Reaktion angestellt, die völlig regelmäßig verläuft.

Am 28. III. nach erneuten zwei Aderlässen wird dieselbe Reaktion mit demselben Ambozeptor und dem wieder frisch entnommenen Blut gemacht, zeigt aber durchwegs negative Resultate, d. h. völlige Lösung aller Röhrchen. Da in der Kontrolle: „Blut in physiologischer NaCl-Lösung allein“ auch eine Spur Lösung vorhanden ist, wird die Schuld der vielleicht nicht ganz isotonischen NaCl-Lösung beigemessen. Jedoch belehrte uns eine Aufschwemmung der roten Blutkörperchen eines anderen Hammels in der gleichen NaCl-Lösung, daß hieran nicht die Störung liegen konnte. Vielmehr zeigte eine erneute Austitrierung des uns bekannten hämolytischen Ambozeptors an den Blutkörperchen des alten und frischen Hammels, daß bei letzterem der Titer wie vorher bei 0.001 lag, während er bei Benutzung der Blutkörperchen des ersten Tieres auf 0.0001 gesunken war. Es konnte also nur eine erhöhte Fragilität der roten Blutkörperchen an der Störung des obigen Versuches Schuld gewesen sein.

Wir geben diese Befunde absichtlich in dieser Ausführlichkeit wieder, um zu zeigen, welche Fehlerquellen den Ungeübten bei Anstellung der Reaktion täuschen und zu ganz falschen Schlußfolgerungen verleiten können, und wie viele Kontrollen deshalb nötig sind. Als praktische Schlüsse für die Reaktion sind aus den in diesem Abschnitt auseinander-gesetzten Tatsachen folgende zu ziehen: 1. Zur Reaktion darf nur ein in seiner Stärke und Avidität zum Komplement durchaus bekannter und austitrierter durch Immunisierung gewonnener hämolytischer Ambozeptor in der für 0.1 Meerschweinchenkomplement erforderlichen doppelt lösenden Dosis angewendet werden. 2. In jedem Versuche hat man sich zu überzeugen, daß die verwendete Menge des Ambozeptors zur Lösung der roten Blutkörperchen vollkommen ausreicht, und daß 3. die roten Blutkörperchen an und für sich in der verwendeten NaCl-Lösung spontan unter Zusatz der betreffenden Menge von Komplement sich nicht lösen.

Nachdem wir in den bisherigen Abschnitten die Fehlerquellen berücksichtigt haben, welche in der Versuchsanordnung als solcher gelegen und nach unseren bisherigen Erfahrungen möglich sind, haben wir uns mit der wichtigen Frage zu beschäftigen: Wie verhält sich ein luetischer Extrakt bzw. ein spezifische Antikörper enthaltendes Serum, wenn man dasselbe nicht mit seiner spezifischen Gegensubstanz, sondern mit der betreffenden normalen, d. h. von nicht Syphilitischen herstammenden Körperflüssigkeit mischt; also beispielsweise, wenn wir luetischen Extrakt nicht mit spezifisch antikörperhaltigem Serum, sondern mit normalem Serum vermengen? Nach Analogie mit allen anderen bekannten und

genau durchstudierten Immunitätsreaktionen mußte von vornherein hier das Verhalten erwartet werden, daß der Unterschied nur ein quantitativer sein kann; denn wir wissen, daß alle bisher bekannten bei der Vorbehandlung in erhöhtem Maße auftretenden Immunsustanzen unter Umständen in geringeren Mengen schon in den normalen Körperflüssigkeiten vorhanden sind. Das sind Dinge, die ja jedem Bakteriologen von den Agglutininen, den bakteriziden Substanzen usw. durchaus geläufig sind. Um so mehr waren wir überrascht, bei unseren sich über 359 Menschen und 89 Affen erstreckenden Untersuchungen bisher nur einen einzigen, sogleich näher zu erwähnenden Fall gefunden zu haben, in dem das Serum eines nachweisbar vorher nichtluetisch infizierten Individuums deutlich die Reaktion aufluetische Antikörper ergab. Wohl haben wir zweimal beobachtet, daß das Serum von Individuen, bei welchen kein Zeichen von Lues vorlag, beim Vermischen mitluetischem Extrakt eine partielle Hemmung der Hämolyse ergab. Diese war aber dann von der Hemmung sicherenluetischen Serums leicht dadurch zu unterscheiden, daß sie durch etwas erhöhten Zusatz von hämolytischem Ambozeptor, d. i. Erhöhung der Avidität zum Komplement, sofort aufgehoben werden konnte, was bei der Hemmung durch Serum von Luetischen nicht möglich war. Auch die durch vorherige Beladung der roten Blutkörperchen mit dem hämolytischen Ambozeptor erhöhte Avidität (vgl. oben) zum Komplement genügte in diesen Fällen, um den sicheren Entscheid zu ermöglichen. Wir lassen es vorläufig dahingestellt, ob diese Erscheinung auf das Vorkommen von geringen Mengen auf Luessustanzen einwirkender Körper im Serum Normaler zurückzuführen ist, also auf ein analoges Verhalten, wie wir es nach dem soeben Gesagten bei allen bekannten Immunitätssustanzen finden, oder ob es sich um andere uns bisher noch unbekannte Einflüsse auf das hämolytische System handelt. Wie schon erwähnt, wir konnten bei genauer Innehaltung der obigen Versuchsanordnung uns bisher nur einmal von dem Vorhandensein antiluetischer Substanzen im Serum eines normalen Individuums überzeugen. Es handelte sich dabei um das Serum eines künstlich vorher nicht infizierten Affen, das mit einem unserer allerdings die schärfsten Ausschläge zeigenden Extrakte, also an spezifischen Stoffen sehr reichen Antigen, deutlich positive Antikörperreaktion ergab.¹ Wenn es sich in diesem Falle wirklich um das Vorhandensein echter Lues-Antistoffe im normalen Serum handelte, so würde das für unsere obige Annahme, daß dies Verhalten voraussichtlich

¹ Das betreffende Tier wurde nach dieser Feststellung inokuliert. Die Beobachtungszeit ist jedoch noch nicht abgelaufen. Bisher hat es keine Symptome von angehendem Primäraffekt.

sich finden muß, sprechen. Denn nach Analogie mit anderen Krankheiten ist dieses Vorkommen normalerweise vorhandener Antikörper nur wahrscheinlich, und es wird sich in der Zukunft darum handeln, genau den Titer festzustellen, bis zu welchem bei Normalen derartige Substanzen vorkommen, und über welchen hinaus sie erst bei spezifisch Erkrankten sich finden. Wir dürfen nicht vergessen, daß wir mit der Ausarbeitung dieser Methode erst im Urbeginn stehen, und daß wir bei ihr genau wie bei der Agglutination im Laufe der Zeit erst die festen Zahlenverhältnisse kennen lernen müssen. — Demgemäß setzt sich nach unserem heutigen Wissensstande ein *lege artis* ausgeführter Versuch der Serodagnostik bei Lues mit Berücksichtigung aller Fehlerquellen folgendermaßen zusammen, wofür wir in den nachfolgenden Tabellen eine Anzahl Beispiele geben wollen.

I. Nachweis spezifischluetischer Stoffe im Organextrakt eines hereditär syphilitischen Fötus und eines syphilitisch infizierten Affen und Nachweis spezifischluetischer Antikörper im Serum der vorbehandelten Affen.

Immunserum: Affe 17. Geimpft 24. XII. 1905. Auftreten des Primäraffektes 20. I 1906, behandelt mit 4 Injektionen (10 bis 20 ^{cem}) sekundärluetischen menschlichen Blutes.

Antigen: 1. Organextrakt eines hereditärluetischen Kindes. (Osteochondr. syphilitic. Spirochaeten in Schnitten.) 2. Knochenmarkextrakt eines Affen, getötet 7 Wochen nach der Impfung.

Kontrolle: 1. Organextrakt eines nicht syphilitischen Fötus. 2. Knochenmarkextrakt eines nicht infizierten Affen.

18. VI. 06.

1	0·1 Immunserum Affe 17	+ 0·1 hered.luet. Kinderextrakt	+ 0·1 Meersch.- Komple- ment	0·002 Kan.- Hammelblut- Ambozeptor (2 × kompl. lös. Dose)	5 prozent. Hammelblut 1 ^{cem}	Hemmung der Hämolyse
2	„	0·1luet. Affen- knochenmarkextr.	desgl.	desgl.		desgl.
3	„	0·1 norm. Kinder- extrakt	„	„		komplette Lösung
4	„	0·1 norm. Affen- knochenmark	„	„		desgl.
5	0·1 norm. Affen- serum	+ 0·1 hered.luet. Kinderextrakt	„	„		„
6	„	0·1luet. Affen- knochenmark	„	„		„

7	0·1 Immunserum Affe 17	NaCl	+ 0·1 Meersch.-Komplement		0·002 Kan.-Hammelblut-Ambozeptor (2× kompl. lös. Dose)	komplette Lösung
8	0·1 norm. Affenserum	NaCl	desgl.		desgl.	desgl.
9	NaCl	0·1 hered.luet. Kinderextrakt	"	Bindung 1 Stunde bei 37°	"	"
10	NaCl	0·1luet. Affenknochenmark	"		"	"
11	NaCl	0·1 norm. Kinderextrakt	"		"	"
12	NaCl	0·1 norm. Affenknochenmark	"		"	"

(Die Kontrollen des hämolytischen Systems sind nicht besonders aufgeführt.)

Dieselben sind: 1. Hämolytisches System allein. 2. Blutkörperchen in NaCl-Lösung. 3. Blutkörperchen + Komplement allein. 4. Blutkörperchen + hämolyt. Ambozeptor allein. 5. Organextrakt + rote Blutkörperchen. Alle Röhrchen werden durch NaCl-Lösung auf gleiches Volumen (5 ^{cem}) gebracht.

II. Nachweis spezifischluetischer Stoffe in der Placenta eines 7 monatlichen hereditärluetischen Fötus und im Knochenmark eines Affen, 8 Wochen nach positiver Impfung getötet, und Nachweis spezifischluetischer Antikörper im Serum von homologvorbehandelten Affen.

Immunserum: Affe 31. Vorbehandelt mit 7 subkutanen Injektionen von 1 bis 3 ^{cem} Knochenmarkextrakt vonluetischen Affen, also Vorbehandlung von Affen mit homologem Affenmaterial.

1	0·1 Immunserum Affe 31	+ 0·1luet. Placentarextrakt	Hemmung
2	" "	0·1 " Affenknochenmarkextr.	"
3	" "	0·1 norm. Placentarextrakt	kompl. Lösung
4	" "	0·1 " Affenknochenmarkextr.	"
5	0·1 norm. Affenserum	+ 0·1luet. Placentarextrakt	"
6	" "	+ 0·1 " Affenknochenmarkextr.	"

(Die übrigen Kontrollen wie oben.)

III. Beispiel des Nachweises von Antikörpern im Serum von Luetikern und der Lumbalflüssigkeit von Patienten mit progressiver Paralyse.

Spezifisches Antigen: Extrakt aus den Organen eines hereditärsyphilitischen Kindes (Osteochondritis, Spirochaeten).

Kontroll-Antigen: Extrakt aus den Organen eines sicher nichtluetischen Kindes.

5. IX. 06.

1	0.1 Serum eines Patienten mit Lues II	0.1luet. Kind	0.1 Meerschw. kompl.	0.002 Kan.-H.-Blut Ambozept. (2× kompl. lös. Dose)	1 cem	Hemmung
	desgl.	0.1 norm. Kind	desgl.	desgl.		kompl. Lösg.
	"	—	"	"		" "
	—	0.1luet. Kind	"	"		" "
	0.1 Serum eines Nicht-Luetikers	0.1 " "	"	"		" "
	desgl.	0.1 norm. Kind	"	"		" "
2	0.1 Lumbalflüssigkeit von progr. Paralyse	0.1luet. Kind	0.1 Meerschw. kompl.	0.002 Kan.-H.-Blut Ambozept. (2× kompl. lös. Dose)	1 cem	Hemmung
	desgl.	0.1 norm. Kind	desgl.	desgl.		kompl. Lösg.
	"	—	"	"		" "
	—	0.1luet. Kind	"	"		" "
	0.1 Lumbalflüssigkeit von Nicht-Luetiker	0.1 " "	"	"		" "
	desgl.	0.1 norm. Kind	"	"		" "

II.

Haben wir nun das Recht zu behaupten, daß es sich bei dem Ausfall eines Versuches, wie er in den obigen Tabellen aufgeführt ist, umluetische Antikörper handelt? Diese Frage müssen wir bejahen und zwar auf Grund folgender Überlegungen und Experimente. Wie aus dem Vorhergehenden zu ersehen ist, machen wir dann den Rückschluß auf das Vorhandensein spezifischluetischer Substanzen bzw. ihrer Reaktionsprodukte in Körperflüssigkeiten, wenn bei der Mischung einer sicherluetische Substanzen enthaltenden Komponente mit einer zu untersuchenden Komponente X unter Vermeidung aller bisher angeführten Fehlerquellen sowie Innehaltung aller Kontrollen und bestimmter Mengenverhältnisse Komplement verankert und so die Hämolyse gehemmt wird. Wenn nun diese unsere Annahme richtig ist, dann muß bei ein und demselbem Individuum, also bei völlig einheitlichem Ausgangsmaterial, das vor der Infektion die Reaktion nicht gab, diese auftreten, nachdem dasselbeluetisch geworden ist. Wir haben derartige Versuche an Affen ausgeführt und zwar in der Art, daß wir Affen mit Lues infizierten und

dann fortlaufend ihr Serum auf das Auftreten von Antikörpern mit Extrakt aus sicher luetischen Föten untersuchten. Derartige Versuche bzw. ihre Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle verzeichnet, wobei selbstverständlich ist, daß jeder einzelne Versuch mit Innehaltung aller obigen Kontrollen, also insbesondere auch das betreffende Affenserum jedesmal auch mit Extrakt aus nicht luetischen Föten geprüft wurde.

Fortlaufende Untersuchung des Serums von luetisch infizierten Affen
auf luetische Antikörper. (A. Neisser und C. Bruck.)

Nr.	A r t	I m p f u n g	Primäraffekt, Tage nach der Impfung	Untersucht nach der Impfung, Tage	Luetische Antikörper
102	Babuin	22. V. 06.	29	41	0
				59	0
				84	0
				96	0
123	Cynomolg.	11. VI. 06.	26	31	0
				53	+
				63	0
				80	0
				94	+
				100	+
161	„	26. VII. 06.	23	35	0
				45	0
				56	+
124	Nemestrinus	11. VI. 06.	26	31	0
				54	0
				64	0
				81	0
				94	+
				100	+
125	Senicus	11. VI. 06.	26	31	0
				49	+
103	Cynomolg.	23. V. 06.	20	68	+
145	„	2. VII. 06	31	32	0
				43	+
				60	0
				65	0
				73	+
101	Cerc. fulig.	22. V. 06.	29	41	0
				59	0
				84	0
				105	0
				114	+

(Fortsetzung.)

Nr.	A r t	I m p f u n g	Primäraffekt, Tage nach der Impfung	Untersucht nach der Impfung, Tage	Luetische Antikörper
144	Cynomolg.	2. VII. 06.	18	21	0
				32	+
				43	0
				54	0
				64	0
				73	0
155	"	25. VII. 06.	22	26	0
				35	0
				45	0
				56	+
154	"	"	22	26	0
				35	0
				45	0
				56	+
159	"	"	24	26	0
				35	0
				45	+
				56	+
158	"	"	24	26	0
				35	0
				45	0
				56	+
157	"	"	34	26	0
				35	0
				45	0
				56	+

Kontrolluntersuchungen an 27 nicht luetischen Affen:

Befund auf Antikörper 26 mal negativ,

" " " 1 „ positiv (siehe oben).

Aus der obigen Tabelle geht hervor, daß bei einer großen Anzahl von Affen Hand in Hand mit dem Fortschritt und Ablauf der Infektion das Serum, das vorher die spezifische Antikörperreaktion nicht gegeben hatte, nunmehr diese aufweist. — Umgekehrt blieb das Verhalten der gleichen Seren zu den Extrakten aus normalen Föten völlig unverändert, d. h. sie gaben nie positive Reaktion. Es hatte also die luetische Infektion einen verändernden Einfluß auf das Verhalten des Serums eines und desselben Affen ausschließlich zu luetischem Antigen ausgeübt, so daß nur der unserer Ansicht nach zwingende Rückschluß übrig bleibt, daß diese Veränderung in einem kausalen Zusammenhange mit der Luesinfektion steht und daher

als eine spezifischluetische Reaktion aufzufassen ist. Daß diese Reaktion nicht bei allen Affen auftritt (Fall 102), ist nicht überraschend. Wir wissen von allen Infektionskrankheiten, daß die Menge der im Serum auftretenden Reaktionsprodukte individuell sehr wechselt, und daß letztere durchaus nicht ausnahmslos bei jedem Individuum zu finden sind. Aus der Tabelle geht weiter hervor, daß der Gehalt des Serums an Luesantikörpern periodischen Schwankungen unterworfen ist. Unser Versuchsmaterial ist natürlich ein viel zu geringes, um irgendwelche gesetzmäßigen Angaben zu machen, oder zu erklären, worauf dies beruht und wie weit es mit dem Verlauf der Krankheit zusammenhängt. Doch steht auch dies Phänomen in völligem Einklang mit unseren Erfahrungen bei anderen Infektionen, von denen wir ebenfalls wissen, daß der Gehalt an spezifischen Antikörpern im Serum keine konstante Größe ist, sondern in Form von Wellenlinien sich äußerst schwankend verhält (Ehrlich und Brieger). Ob speziell bei Lues diese Schwankungen mit neuen Schüben seitens des Krankheitserregers in die Blutbahn zusammenhängen, ist um so schwerer zu entscheiden, als wir ja bei dieser Krankheit vorläufig immer noch mit Reagentien prüfen, deren Gehalt an spezifischen Substanzen uns nicht wie bei kultivierbaren Mikroorganismen bekannt ist. — Die in der vorigen Tabelle wiedergegebenen Experimente stimmen nun andererseits vollkommen überein und werden in ihrer Beweiskraft noch dadurch verstärkt, daß auch das Serum der Affen, welche von uns zwecks Gewinnung spezifischen Serums vorbehandelt wurden, erst im Laufe der Vorbehandlung die Fähigkeit der spezifischen Reagierbarkeit mit luetischem Material gewannen. Demgemäß können wir den Schluß machen, daß es sich hier mit Sicherheit im Prinzip um eine spezifische Reaktion auf luetisches Material bzw. dessen Antistoffe handelt.

Da Wassermann und Bruck bei einer Gelegenheit, bei welcher sie diese Reaktion für andere Zwecke¹ verwerteten, der Einwand von Weil und Nakajama² gemacht wurde, daß es sich bei der Komplementbindung nicht um einen spezifischen Bindungsvorgang, sondern um die Summierung zweier Effekte handle, so wollen wir auch hierauf in aller Kürze eingehen. Die genannten Autoren stützen sich dabei auf die von uns von Anbeginn an hervorgehobene Tatsache³, daß sowohl Sera, als besonders auch Extrakte in höheren Dosen bereits allein Komplement absorbieren. Sie glauben nun, daß, wenn zwei an sich nicht hemmende,

¹ *Deutsche med. Wochenschrift*. 1906. Nr. 12.

² *Münchener med. Wochenschrift*. 1906. Nr. 21.

³ Vgl. in dieser Hinsicht die Arbeit von A. Wassermann u. Bruck, *Münch. med. Wochenschrift*. 1906.

also unterhalb der alleinhemmenden Dose liegende Komponenten zusammengemischt werden, diese beiden sich in ihrer Wirkung addieren, so daß sie nun hemmend wirken. Es handle sich also nicht um einen chemischen Zusammentritt von Antigen und Antikörper und dadurch bedingte Komplementbindung, sondern einfach um die Addierung zweier an und für sich nicht hemmender Dosen zu einer hemmenden. Wir sind an anderer Stelle¹ ausführlich auf diesen Einwand eingegangen und können uns daher hier kürzer fassen, indem wir in der nachfolgenden Tabelle Versuche anführen, aus denen sich schon rechnerisch die Unmöglichkeit einer solchen Deutung ergibt.

1. Bestimmung der alleinhemmenden Dosis des Syphilisaffenimmunsersums 113.

0.1 Meerschw. Komplement	+ 0.1 Affenimmunserum	Hämolytischer Ambozeptor + Blutkörp.	komplette Lösung
" "	0.2 "	" "	" "
" "	0.3 "	" "	" "
" "	0.5 "	" "	" "

2. Bestimmung der alleinhemmenden Dose desluetischen Fötalextraktes 556.

0.1 Meerschw. Komplement	+ 0.1 Luesextrakt	Hämolytischer Ambozeptor + Blutkörp.	komplette Lösung
" "	0.2 "	" "	" "
" "	0.3 "	" "	" "
" "	0.4 "	" "	" "
" "	0.5 "	" "	" "

3. Bestimmung der alleinhemmenden Dose des normalen Fötalextraktes 453.

0.1 Meerschw. Komplement	+ 0.1 Normalextrakt	Hämolytischer Ambozeptor + Blutkörp.	komplette Lösung
" "	0.2 "	" "	" "
" "	0.3 "	" "	" "
" "	0.4 "	" "	Hemmung
" "	0.5 "	" "	" "

4. Spezifische Reaktion des Immunsersums 113 mit Extrakt 556.

0.1 Immunserum 113	+ 0.1luet. Extrakt 556	+ 0.1 Meerschw. kompl.	Hämolytisches System	Hemmung
"	0.1 norm. " 453	"	"	kompl. Lösg.
0.5	—	"	"	"
—	0.5 Extrakt 556	"	"	"
0.1 norm. Affenserum	+ 0.1 " 556	"	"	"

¹ *Münchener med. Wochenschrift.* 1906.

Aus der vorstehenden Tabelle ergibt sich also, daß, obwohl die allein-hemmende Dose sowohl des Immunserums als desluetischen Extraktes oberhalb 0.5 liegen, beim Mischen von nur 0.1 beider Komponenten bereits eine spezifische Reaktion eintritt. 0.1 normaler Extrakt dagegen ergibt mit 0.1 Immunserum keinen Ausschlag, obgleich die alleinhemmende Dosis dieses normalen Extraktes niedriger (bei 0.4) liegt, als die des spezifischen Extraktes.

Dieselben Verhältnisse, und zwar noch evidenter, zeigt folgendes Protokoll, in welchem die Reaktion mit dem Serum eines nicht durch steigende Vorbehandlung immunisierten, sondern durch bloße Infektionluetischen Affen, der im Verlaufe der Infektion starken Antikörpergehalt erworben hatte, angestellt wurde.

Alleinhemmende Dose desluetischen Organextraktes Nr. 556: 0.5 adsorbiert noch kein Komplement. — 16. X. 1906. Alleinhemmende Dose des Affenserums Nr. 144: 0.5 ergibt noch komplette Lösung.

0.1 Serum 144	+ 0.1 Extrakt 556	völlige Hemmung
"	0.05 " "	" "
"	0.025 " "	große Kuppe
"	0.01 " "	inkomplett
0.1—0.5 Serum 144	allein	komplette Lösung
0.1—0.5 Extrakt 556	"	" "
0.1 Serum 144	+ 0.1 norm. Extrakt	" "
0.1 norm. Affenser.	+ 0.1 Extrakt 556	" "

In diesem Versuche zeigt also eine Dosis des antikörperhaltigen Serums, die zum mindesten fünffach unter der alleinhemmenden liegt, vermischt mit einer Dosis Antigen, die mindestens fünfzigfach unter der alleinhemmenden liegt, noch eine Hämolysehemmung.

Der Einwand der Summierung im Sinne von Weil und Nakajama ist also dem Ergebnisse unserer Versuche unmöglich zu machen. Daß aber die beschriebene Reaktion bei richtiger Ausführung nur das Vorhandensein spezifischer Substanzen anzeigt, eine Annahme, an der nach den bisherigen Darlegungen unserer Meinung nach nicht gezweifelt werden kann, und daß eine Täuschung durch Hämolysebehemmung seitens nicht spezifischer Stoffe ausgeschlossen ist, erhellt auch besonders deutlich aus folgendem Versuch (Bruck): Bekanntlich sind spezifische Antigene nicht kochbeständig, während nicht spezifisch hemmende Substanzen durch Hitze nicht zerstört werden (M. Neisser und Sachs). Es kann also eine positive Reaktion, die auf der Anwesenheit spezifischer Antigene beruht, nicht mehr eintreten, wenn das Antigen vorher gekocht worden ist, während eine positive Reaktion, die durch nicht spezifische Stoffe vorgetäuscht wird, durch Erhitzen des

Antigens in ihrem positiven Ausfall nicht verändert wird. — Bereits M. Neisser und Sachs weisen auf diese äußerst wichtigen Verhältnisse in ihrer ersten Mitteilung hin. Wie verhält sich dies in unserem Falle?

6. X. 1906.

0.1 Immunser. Affe 17	+ 0.1 luet. Kinderextr. ungekocht	völlige Hemmung
„ „	0.1 „ „ gekocht	komplette Lösung
0.1 antikörperhaltiges Menschenserum von Lues II	+ 0.1 luet. Kinderextr. ungekocht	völlige Hemmung
desgl.	+ 0.1 „ „ gekocht	komplette Lösung

Die übrigen Kontrollen wie gewöhnlich.

Es geht also aus diesem Versuch hervor, daß die mit Immunserum die Hämolysehemmung bedingenden Stoffe derluetischen Extrakte durch Hitze zerstört werden, daß sie spezifischer Natur sein müssen. Nach alledem handelt es sich also bei der beschriebenen Reaktion um einen echten Bindungsvorgang zwischen spezifischem Antigen und seinem zugehörigen Antikörper im Sinne Ehrlichs.

III.

Wenden wir uns nun zu der Frage der praktischen Verwertbarkeit der soeben auseinandergesetzten Methode, so möchten wir vor allem einen Überblick darüber geben, welch' ungemein reiches Material der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt.

1. Untersuchung von menschlichem syphilitischem Material auf Luesstoffe (Antigen) mittels spezifische Antikörper enthaltender Seren.

	unter- sucht	positiv	negativ
Extrakte aus den Organen sicher syphilitischer Föten	29	29	0
Extrakte aus d. Placenten dieser Kinder	17	13	4
Primäraffektextrakte	5	5	0
Kondylomextrakte	9	8	1*
Extrakte aus primären Bubonen . . .	4	4	0
Gummaextrakte und Tubero-serpiginös } Syphilidextrakte }	5	5	0
Gehirnextrakte von progr. Paralyse .	7	0	7

* Fehler bei der Zubereitung d. Extr.

Kontrolluntersuchungen mit normalen Präparaten: 14 mal. Alle negativ.

2. Untersuchung der Organe syphilitisch infizierter Affen auf Luesstoffe. (Antigen.)

Untersucht wurden im ganzen 17 kutan geimpfte Tiere.

Positive Reaktion: bei 10, und zwar am 25., 42., 46., 54., 63., 74., 105., 268., 290. Tage nach der Injektion.

Negative Reaktion: bei 7, und zwar am 82., 85., 92., 95., 128., 154., 204. Tage nach der Infektion.

Man sieht, daß die negativ reagierenden Extrakte sämtlich von solchen Tieren stammen, die schon vor längerer Zeit infiziert worden waren. Die am 74., 105., 268., 290. Tage untersuchten und positiv reagierenden Organe stammen sämtlich von Tieren, denen post infect. fortlaufend Luesmaterial subkutan oder intravenös zugeführt worden war.

Kontrolluntersuchungen an Organen gesunder Affen: 5, stets negativ.

3. A. Untersuchung der Blutseren von sicheren Luetikern auf Antikörper mittels sicher syphilitischer Extrakte¹ als Antigen.

	Untersucht	positiv	negativ
Primäre Fälle . . .	25	2	23
Sekundäre Fälle . .	101	27	74
Tertiäre Fälle . . .	37	8	29
Frühlatente Fälle . .	41	6	35
Spätlatente Fälle . .	53	6	47
Im ganzen	257	49	208

Es mag bei Betrachtung dieser Tabelle vielleicht auffallend erscheinen, daß wir bei der Prüfung von 257 Luetikerseren nur 49 mal spezifische Antikörper finden konnten. Wir möchten deshalb in dieser Hinsicht besonders die Aufmerksamkeit darauf hinlenken, daß wir in allen diesen Fällen das Blut auf Antikörpergehalt und nicht auf Gehalt an syphilitischen Substanzen, Antigen, geprüft haben. Wohl haben wir (A. Neisser und C. Bruck) auch letztere Untersuchungen in vivo und zwar mittels des Extraktes der roten Blutkörperchen der betreffenden Patienten und

¹ Hierzu kommen 10 Patienten, bei denen die Diagnose Syphilis nicht mit Sicherheit gestellt werden konnte: sämtlich mit negativem Antikörperbefund.

² Anm. von A. Wassermann: Ich möchte nicht verfehlen, hier noch besonders darauf hinzuweisen, daß nach den Befunden von mir und Plaut das Blutserum besonders von Individuen mit Lues-Anamnese bisweilen allein, d. h. ohne Antigen-Zusatz in äußerst kleinen Mengen (bis 1:100) die Hämolyse hemmte. — Es ist deshalb gerade bei diesen Versuchen die Kontrolle „Serum allein“ nie zu verabsäumen, da sonst der Versuch keine Bedeutung besitzt.

Affen in zahlreichen Fällen ausgeführt. Zu diesem Behufe wurde der Blutkörperchenextrakt (nach der oben angegebenen Methode hergestellt, 1^{cem} abzentrifugierter Blutkörperchen mit 4 bis 5^{cem} 0.5 Prozent Karbol enthaltender 0.85 prozentiger NaCl-Lösung geschüttelt und dann sofort zentrifugiert) mit spezifischem Affenimmenserum versetzt. Im ganzen wurde in dieser Weise das Blut von 262 syphilitischen Menschen und 32 Affen auf die Gegenwart von syphilitischen Substanzen (Antigen) geprüft. Zur Kontrolle wurde das Blut von 85 sicher nicht Luetikern untersucht.

Wir möchten indessen diese Untersuchungen noch weiter fortführen, ehe wir darüber uns endgültig äußern, da gerade das Arbeiten mit den Extrakten der roten Blutkörperchen sehr kompliziert ist, und es daher noch größerer Versuchsreihen bedarf, ehe ein sicheres Urteil über diesen praktisch diagnostisch wichtigsten Punkt gewonnen werden kann.

B. Untersuchung des Serums gesunder und an anderen Krankheiten leidender Menschen ohne Luesanamnese auf Luesantikörper. (A. Neisser und C. Bruck.)

Untersucht	positiv	negativ
92	0	92

4. Untersuchungen von Lumbalflüssigkeiten.¹
(A. Neisser und C. Bruck.)

Diagnose	Frühere Syphilisinfection	Antikörper in der Lumbalflüssigkeit	Antikörper im Blute
Progressive Paralyse	ja	+	
" "	"	0	
" "	"	0	0
" "	"	0	+
" "	unbekannt	0	
" "	"	+	
" "	"	+	0
" verdächtig	"	+	
Tabes	ja	+	
"	"	0	
"	fraglich	+	
Lues cerebri	ja	+	0
" "	"	0	0
" "	"	0	
" " fraglich	fraglich	0	

¹ Näheres siehe in der Arbeit von A. Wassermann u. Plant, *Deutsche med. Wochenschr.* 1906,

(Fortsetzung.)

Diagnose	Frühere Syphilisinfektion	Antikörper in der Lumbalflüssigkeit	Antikörper im Blute
Delirium tremens	ja	0	
Apoplexia cerebri	„	+	
Epilepsie	„	0	0
Lues secundaria		+	
Lues tert.		0	
Spätperiode latent		0	
„ „		+	

Trotz dieses großen Materials stehen wir durchaus an, die vorliegende Methode heute bereits als für die Praxis reif und in jedem Falle zweifellos sichere Ergebnisse liefernd hinstellen, und zwar aus dem Grunde, weil wir speziell bei Lues nicht mit genau quantitativ meßbaren, uns in jeder Beziehung bekannten und kultivierbaren Erregern arbeiten können. Weiterhin sind, wie wir gesehen haben, selbst für den Geübten die Fehlerquellen, die im Laufe kurzer Zeit in den Reagentien oft eintretenden Veränderungen und Umlagerungen zu zahlreich möglich und in ihrer Ursache und Vermeidbarkeit noch zu wenig bekannt, als daß wir diese Methode bereits als reif für die Praxis zur diagnostischen Verwendung empfehlen könnten. Vielmehr handelt es sich für uns vorläufig nur um das Prinzip als solches, d. h. um die gelungene prinzipielle Feststellung, daß es möglich ist, auf serodiagnostischem Wege eine spezifische Reaktion vonluetischem Antigen undluetischen Antikörpern zu erhalten.

Damit ist nichts weiter als eine vorläufig rein wissenschaftliche Tatsache gefunden. Inwieweit diese im einzelnen Falle sich wird nachweisen lassen, inwieweit sich die einzelnen Gewebe und Gewebsextrakte dabei verschieden verhalten werden, inwieweit uns bisher noch nicht bekannte Fehlerquellen die praktische Verwertbarkeit am Kranken eventuell einschränken, das müssen vielfältige weitere Untersuchungen ergeben. Am nötigsten erscheint in dieser Hinsicht vor allem der Versuch die Methode dahin auszuarbeiten, daß man mit Hilfe genau austitrierter und haltbar konservierter Standardextrakte und Seren ein quantitatives Arbeiten ermöglicht, um so vor allem die Grenze festzustellen, über welche hinaus sich die Reaktion niemals bei Gesunden findet. Wer die Entwicklung der biologischen Diagnostik mit erlebt hat, der weiß, welche widersprechenden Resultate anfangs die einzelnen Autoren, selbst mit so einfachen Methoden wie es die Agglutination und der Pfeiffersche Versuch sind, erhalten haben. Wenn wir uns erinnern, wie lange Zeit verfloßen ist, und wieviel Kämpfe es gekostet hat, bis die Spezifität des Pfeiffer-

schen Versuches und der Agglutination sich durchgerungen hat, welche geringsten Abweichungen in der Versuchstechnik noch heute einen derartigen Versuch in der Hand des einen positiv und in der des anderen negativ erscheinen lassen, so wird man unseren vorsichtigen Standpunkt angesichts einer so komplizierten Methode und der eventuell entscheidenden Konsequenzen, die gerade bei Lues in der Praxis aus einem Versuchsergebnisse gezogen werden können, verstehen und würdigen. Also nicht eine Methode für den Praktiker, sondern vorläufig die rein wissenschaftliche Tatsache, daß man in manchen Fällen bei Lues auf serodiagnostischem Wege mittels der spezifischen Komplementbindung eine spezifische Reaktion erhalten kann, ist es, die wir in der vorliegenden Arbeit und ihren Protokollen wiedergeben wollen.

Bei der Durchführung der Versuche hatten wir uns der Unterstützung zahlreicher Herren zu erfreuen, die uns Material zur Verfügung stellten. Ihnen allen, insbesondere den Herren: Alter (Leubus), Arnold (Heidelberg), Asch (Breslau), Bauer (Stettin), Baumm (Breslau), Bonhoeffer (Breslau), Brieger (Breslau), Bumm (Berlin), Fr. Chotzen (Breslau), Epstein (Prag), E. Fränkel (Hamburg), v. Franqué (Prag), Garré (Breslau), Hahn (Breslau), Hannes (Breslau), Harttung (Breslau), Herxheimer (Frankfurt a. M.), Hübner (Frankfurt a. M.), Köstlin (Danzig), Krause (Breslau), Küstner (Breslau), Lichtheim (Königsberg), Clemenz, Neisser (Bunzlau), Ernst Neisser (Stettin), Nonne (Hamburg), Poten (Hannover), v. Rosthorn (Heidelberg), Salge (Dresden), Schallehn (Stettin), Schröder (Breslau), R. Stern (Breslau), v. Strümpell (Breslau), Tietze (Breslau), Voemel (Frankfurt a. M.), Zinsser (Köln), sagen wir unsern herzlichsten Dank.
