

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium der Universität zu Brüssel.]
(Director Dr. Funck.)

Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination.

Zweiter Theil.¹

Von

Dr. A. Joos,

In dem zweiten Theile dieser Arbeit wollen wir experimentell nachweisen, dass die Agglutination eine chemische Reaction ist, dass dabei eine wahre Verbindung stattfindet, und dass diese Verbindung mit der Bildung eines neuen Körpers endet. Wir betrachten am Schlusse dieses Abschnittes die Wirkung anderer Salze im Agglutinationsphänomen.

§ 1. Die Agglutination ist eine chemische Verbindung.

Wir haben gesehen, dass die Agglutination eine Verbindung dreier Substanzen ist, von denen zwei ganz specifisch zu betrachten sind: die agglutinirende und die agglutininbare Substanz; während die dritte, das Salz, nicht specifisch ist.

Wie haben wir den Ausdruck „Verbindung“ zu verstehen? M. a. W.: Vollzieht sich die Vereinigung dieser drei Substanzen nach den Grundgesetzen der Chemie und muss die Agglutinationserscheinung in die Gruppe der chemischen Verbindungen im eigentlichen Sinne eingereiht werden? Oder müssen wir diese Erscheinung zur Classe jener noch unvollständig erklärten Phänomene zählen, welche weder den allgemeinen Gesetzen der Chemie folgen, noch als wahre chemische Verbindungen, wie z. B. einige Färbungserscheinungen, betrachtet werden können? Es ist bekannt, dass

¹ S. Bd. XXXVI. S. 422 ff.

gewisse pflanzliche oder thierische Fibern den Lösungen die in ihnen aufgelösten Farbstoffe entziehen. Diese Reaction, welche 'unter allen Proportionen aufzutreten scheint, welches auch immer die relativen Mengen der vorhandenen Substanzen sein mögen, wird gewöhnlich nicht als wahre chemische Verbindungen, sondern als Aeusserungen physikalischer Kräfte angesehen. Gewisse Autoren betrachten sie als Erscheinungen der moleculären Fixation oder der Porosität. Das organische und das färbende Molecül haften sich mehr oder minder energisch an einander, doch entsteht aus dieser Einigung keine bestimmte chemische Zusammensetzung, indem keine constante Beziehung zwischen den Molecülen der in Frage kommenden Species besteht.

Wir haben uns vorgenommen, durch quantitative Untersuchungen zu zeigen, ob die Verbindung der specifischen Substanzen des Serums und der Bacillen mit dem Salze eine chemische Verbindung im eigentlichen Sinne sei, oder ob dieselbe als das Ergebniss der Festsetzung heterogener Partikelchen ohne Dazwischenkunft chemischer Kräfte angesehen werden muss. Wenn diese letztere Hypothese erwiesen wäre, so wäre die Agglutination einer in Folge der Intervention physischer Kräfte herbeigeführten moleculären Fixation zuzuschreiben, welche an gewisse Erscheinungen der Porosität erinnert (z. B. das Festhalten gewisser Farbstoffe durch Knochenkohle), welche von Chevreul als „capilläre Affinität“ bezeichnet wurden.

Es handelt sich demnach um zwei Hypothesen:

1. Entweder ist die Verbindung chemischer Ordnung und muss den Grundgesetzen der Chemie, besonders dem Gesetze der constanten Proportionen folgen.

2. Oder aber sie ist physikalischer Ordnung und die Reaction wird eintreten, ohne dass irgend eine beständige Beziehung unter den relativen Mengen der in die Reaction eintretenden Substanzen beobachtet werden könnte.

Wir werden in diesem Abschnitt untersuchen, ob der Agglutinationsvorgang dem Gesetze der constanten Proportionen folgt.

Wir haben bereits vorher einige Versuche citirt, welche der Vermuthung Raum geben, dass die Agglutination von einer wahren chemischen Verbindung herrühre.

So haben wir gesehen, dass wir, wenn ganz salzfreie Mikroben mit agglutinirender Substanz imprägnirt sind, durch Zusetzung von NaCl in kleinen Dosen eine fractionirte Agglutination erhalten, so wie auch ein fractionirter Niederschlag zu erhalten ist, wenn einer Lösung nach und nach ein Reagens zugesetzt wird, welches das Salz, das sich darin aufgelöst

befindet, zum Niederschlage bringen kann. Und dieser bakterielle Niederschlag ist vollkommen proportionell der Menge des Salzes, welche zugesetzt wurde, wovon man sich leicht auf verschiedene Arten überzeugen kann.

Erstens kann man die Agglutination in engen Reagensgläsern, auf welchen man mittels einiger Feilstriche gleiche Raumeinheiten angezeichnet hat, hervorrufen. Sobald sich der Niederschlag abgesetzt hat, sieht man sehr deutlich, dass der Bodensatz, welcher durch 1^{mg} hervorgerufen ist, nicht derselbe ist als der, welcher durch 2, 3 bis 10^{mg} NaCl erzeugt wird. Wir bemerken, dass das Volumen des Niederschlages niemals ganz genau proportionell der beigefügten Salzmenge ist, denn je mehr dieses Volumen zunimmt, um so mehr häuft er sich zusammen. Doch findet man in Niederschlägen, welche unter denselben Bedingungen durch verschiedene (doch sehr kleine) Dosen von NaCl erhalten wurden, sehr charakteristische und constante Unterschiede.

Zweitens kann man einer Reihe von Reagensgläsern, welche alle dieselbe Menge dialysirter Emulsion und Serum enthalten, verschiedene Quantitäten von Salz zusetzen und den Niederschlag centrifugiren; die oben schwimmende Flüssigkeit wird hierauf decantirt und der Bodensatz in ganz gleichen Mengen destillirten Wassers emulsionirt. Hierauf vergleicht man die Dichtigkeit der Emulsionen durch die in der Chemie gebräuchlichen colorimetrischen Verfahren.

Man kann auch beweisen, dass für eine gegebene Mischung von Serum und Typhusemulsion ein bestimmtes Gewicht von NaCl immer dasselbe Niederschlagsquantum liefert.

In diesen Versuchen constatirt man nun, dass eine ganz bestimmte und gleichbleibende Beziehung zwischen der Menge des erhaltenen Niederschlages und der Menge des beigesetzten Salzes besteht. Diese That-sachen sind daher vollkommen identisch mit jenen, welche den fractionirten Niederschlag einer salzigen Lösung charakterisiren. Die Verbindung der agglutinirenden und agglutininbaren Substanz bildet eine Zusammensetzung, welche nur dann ausfällbar wird, wenn man in ihre Molecüle Salz einführt, und diese Verbindung vollzieht sich in sehr bestimmten Proportionen.

Wir können auch beweisen, dass, um eine bestimmte Typhusemulsion zu agglutiniren, ein bestimmtes Salzquantum nöthig ist. Es ist gleichgültig, ob man dieses Quantum auf einmal oder in mehreren Fractionen der Emulsion beifügt.

Andererseits haben wir gleichfalls gesehen, dass es zur Hervorbringung der Agglutination genügt, wenn man mit Salz imprägnirten Mikroben agglutinirende Substanz zusetzt. Es ist durchaus nicht nothwendig, dass die Lösung Salz enthalte, um die Erscheinung auftreten zu lassen. Dieser

Umstand schiebt, unseres Erachtens, jene Theorien bei Seite, welche die Agglutination als ein physikalisches Phänomen betrachten. Des Weiteren spricht es auch für unsere Ansicht, dass auch ganz geringfügige Mengen von Salz genügen, um die mit agglutinirender Substanz imprägnirten Bakterien zum Niederschlage zu bringen.

Wir führen nur die vorstehenden Beobachtungen an; wenn man sich jedoch die Mühe nimmt, die im ersten Theile dieser Arbeit angeführten Experimente aufmerksam zu prüfen, so wird man finden, dass sie alle für die chemische Natur des Agglutinationsvorganges sprechen.

Wir können auch durch analogere, wie die hier erwähnten Experimente nachweisen, dass dieselbe Menge agglutinirbarer Substanz jeweils durch dieselbe Menge agglutinirender Substanz niedergeschlagen wird.

Experiment: Vorerst bestimmen wir genau die kleinste Menge von Serum, welche nöthig ist, um eine Typhusemulsion (durch Einrührung einer 24 stündigen Cultur auf Agar in 10^{ccm} physiologischer Lösung bereitet) im Verlaufe von etwa einer Stunde vollständig zu agglutiniren.

Nach Feststellung dieser Einheit bereiten wir einige Reagensgläser, welche jedes genau dieselbe Menge einer und derselben bakteriellen Emulsion enthalten. Wir setzen dem ersten Reagensglas eine beliebige Menge von Serum zu, um eine vollständige Agglutination zu erhalten; den anderen setzen wir verschiedene Bruchtheile dieser Menge bei und stellen Alles während einer Stunde bei 37° in den Brutschrank. Das Volumen der Niederschläge wird offenbar in den verschiedenen Gläsern verschieden sein. Wir centrifugiren nun und, nach Decantirung der oben schwimmenden Flüssigkeiten, fügen wir bei allen eine neue Quantität Serumlösung bei und setzen die Mischung nochmals bei 37° in den Brutschrank. In den Gläsern, welche noch Typhusemulsion enthalten, bildet sich ein Niederschlag, welcher in allen gleich ist, da sie alle dieselbe Serummenge erhalten haben. Wir centrifugiren neuerdings und fügen den decantirten oben schwimmenden Flüssigkeiten eine neue Dosis von Serum zu. In den noch trüben Flüssigkeiten bildet sich eine neue Agglutination, und wenn wir diese Versuche fortsetzen, so können wir beweisen, dass, um die ganze agglutinirbare Substanz einer Typhusemulsion zu agglutiniren, jedem Theile eine eben solche Menge von Serum zugesetzt werden muss, als nöthig ist, um, auf einmal zugesetzt, die vollständige Agglutination zu erzeugen.

Man kann sich leicht überzeugen, dass das Volumen des erhaltenen Niederschlages proportional ist der der Mischung beigelegten Serummenge.

Diese Experimente ergänzen daher die vorhergehenden. Im Vereine thun sie dar, dass es zur vollständigen Agglutination einer bestimmten Menge mikrobischer Emulsion (die also eine genau bestimmte Menge agglutinirbarer Substanz enthält), einer bestimmten Menge von Serum und einer bestimmten Menge von Salz bedarf. Es findet sich demnach in dieser Erscheinung das Gesetz von den constanten Proportionen in Geltung.

Unsere Versuche beweisen vielleicht nicht, dass dieses Gesetz vom rein chemischen Gesichtspunkte aus genau eingehalten wird, da wir die absoluten Mengen der in die Verbindung eintretenden Elemente nicht mit strenger Genauigkeit erheben können. Da wir uns hier aber noch unbekannten Körpern gegenüber befinden, welche unmöglich in ihrem reinen Zustande gewonnen werden können, so erachten wir dieses Gesetz als genügend nachgewiesen, da wir beweisen konnten, dass eine relative Menge einer der Substanzen sich immer mit denselben relativen Mengen der beiden anderen verbindet. Wir müssen thatsächlich annehmen, dass gleiche Mengen derselben mikrobischen Emulsion immer eine gleiche absolute Quantität agglutinirbarer Substanz enthalten. Ebenso enthalten gleiche Mengen von Serumlösungen dieselben absoluten Mengen agglutinirender Substanz.

Wir glauben damit das Gesetz der bestimmten Proportionen dargethan zu haben, da wir bewiesen haben, dass eine gegebene Menge bakterischer Emulsion sich immer mit einer gleichbleibenden Menge von Serumlösung bindet, um eine bestimmte Zusammensetzung zu ergeben. Was die Salzmenge betrifft, die dazu nöthig ist, so lässt sich dieselbe leicht experimentell erheben.

Wenn man aber die Bedingungen des Experimentes ein wenig ändert, kann man sehr verschiedene Resultate erhalten. Z. B.: Wir haben bei einem vorausgegangenen Versuche die kleinste Serumdosirung gesucht, welche eine Typhuscultur, in 10^{cem} physiologischem Wasser aufgeschwemmt, vollständig agglutinirt. Diese kleinste Dosis ist z. B. 2^{cem} einer verdünnten Lösung. Anstatt aber diese Serumlösung auf eine Typhuscultur einwirken zu lassen, bringen wir in ein Reagensglas 2^{cem} der Serumlösung und dann bloss $\frac{1}{2}$ Cultur von Typhus und so viel physiologische Lösung als nöthig ist, um 10^{cem} zu fällen. Nachdem die Agglutination stattgefunden hat, centrifugiren wir, rühren $\frac{1}{2}$ Typhuscultur in die oben schwimmende Flüssigkeit und bringen Alles bei einer Temperatur von 37° zurück. Wir sollten eine neue Agglutination constatiren müssen, da die Mischung im Anfang genug Serum enthielt, um eine ganze Cultur zu agglutiniren. Doch bildet die Flüssigkeit keine Spur von Niederschlag und bleibt immer trübe und homogen. Dieser Versuch erscheint im

ersten Augenblicke im Widerspruch mit den ersten, da sich eine gleiche Dosis agglutinirender Substanz unterschiedslos mit verschiedenen Mengen agglutinirbarer Substanz verbindet.

Wenn man aber diesen Versuch vervollständigt, so constatirt man leicht, dass die Niederschläge, welche in diesen verschiedenen Fällen erhalten worden sind, nicht dieselben Eigenschaften besitzen.

Um dies zu beweisen, haben wir das folgende Experiment zu machen:

Experiment: Man nimmt vier Reagensgläser, deren beide ersten, A und B, eine agglutinirende Serumdosis und eine Agarcultur in 10^{cem} physiologischer Lösung eingerührt enthalten; die beiden anderen, C und D, enthalten auch eine Agarcultur, gleichfalls in 10^{cem} physiologischer Lösung eingerührt, und ein Multiplum der einfachen agglutinirenden Serumdosis (ohne Ueberschuss). Das Ganze wird auf 37° gebracht und hierauf centrifugirt, um die Niederschläge zu agglomeriren. Diese letzteren werden in 10^{cem} physiologischer Lösung aufgeschwemmt und in die Emulsionen der Niederschläge A und C wird 1 Typhuscultur beigefügt. Alles wird während einiger Stunden bei 37° in den Brutschrank gesetzt, und man lässt die Niederschläge sich wieder ganz von Neuem bilden.

Man bemerkt sodann, dass die in dem Glase A zugesetzte Cultur in der Flüssigkeit suspendirt geblieben ist, und dass sie das Volum des Niederschlages nicht vergrößert hat.

Im Gegentheil hat sich die Höhe des Niederschlages, der sich in C gebildet hat, erheblich vermehrt, und das Volumen des Bodensatzes übersteigt beträchtlich das Volumen des in D entstandenen Niederschlages. Es ist klar, dass sich ein Theil der agglutinirenden Substanz, welche sich in der ersten Agglutination mit der agglutinirbaren Substanz verbunden hat, auf die agglutinirbare Substanz der, in der nach Centrifugirung beigefügten frischen Cultur enthaltenen Mikroben fixirt hat.

Vorübergehend wollen wir bemerken, dass es sich hier nicht um eine mechanische Mitreissung handelt, weil, wenn man anstatt der Typhusbacillen andere Mikroben, z. B. das Bacterium coli oder Choleravibrionen, zusetzt, das Volumen des Niederschlages nicht grösser wird und der zugesetzte Coli oder Cholera in der Flüssigkeit in Emulsion verbleibt.¹

Es besteht daher ein bedeutender Unterschied zwischen den Zusammensetzungen, welche man erhält, wenn man dieselbe Menge agglutinirender mit verschiedenen Mengen agglutinirbarer Substanz verbindet. Die

¹ Um in diesem Controlversuch eine ganz typische Erscheinung zu erzeugen, ist zu empfehlen, sehr bewegliche Bakterien zu benutzen, da diese letzteren leichter in der Emulsion bleiben und nicht so rasch wie unbewegliche durch den sich bildenden Niederschlag mitgerissen werden.

Verbindung, welche das Minimum der agglutinirbaren und das Maximum der agglutinirenden Substanz (die Maximalverbindung) enthält, ist sehr stabil und kann sich mit neuen Mengen agglutinirbarer Substanz vereinigen, und so neue Verbindungen ergeben. Wenn wir die Action der agglutinirbaren Substanz mit der Action einer mehrbasischen Säure, welche sich mit den Basen in mehreren Proportionen verbinden kann, vergleichen, so geben wir von der Erscheinung ein klares, aber vielleicht etwas unrichtiges Bild. Die erhaltenen Verbindungen sind mehr oder weniger stabil je nach ihrem Saturationsgrad. Der stabilste ist die Maximalverbindung, welche am meisten agglutinirender Substanz enthält. Doch ist die Action der specifischen Substanzen und des Salzes auf einander nicht so energisch wie die, welche die Verbindung einer Säure mit einer Base charakterisirt; sie kann besser mit der Doppelsalzbildung verglichen werden.

Das oben erwähnte Experiment zeigt uns, dass die Verbindung dieser Substanzen sich in verschiedenen Proportionen vollzieht, um verschiedene Körper zu bilden. Um unsere Ansicht noch fester zu begründen, wollen wir die Unterschiede dieser verschiedenen Verbindungen feststellen.

Experiment: Wir nehmen eine Reihe von Reagensgläsern, in welche wir eine gleiche Menge Emulsion von Typhusbacillen in physiologischer Lösung (z. B. 2^{cem} entsprechend eine Agarcultur) geben. Hierauf setzen wir stufenweise steigende Mengen von Serum zu, welches in NaCl-Lösung so verdünnt ist, dass z. B. 1^{cem} der Verdünnung beiläufig einer einfachen agglutinirenden Dosis entspricht.

Hierauf setzen wir je nachdem 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 . . . 8.0^{cem} der Lösung von Typhuserum zu. (Wir werden nun jedes Reagensglas nach der Menge von diluirtem Serum bezeichnen, welche es enthält.) Die Agglutination vollzieht sich zwar in allen Gläsern, doch mit verschiedener Intensität, und zwar langsam dort, wo wenig Serum enthalten ist, und rasch, fast augenblicklich dort, wo viel vorhanden ist. Nach einer Stunde Verweilens bei 37° zeigt sich der Niederschlag in den Gläsern, welche viel Serum enthalten, gut angesammelt, während in den zu serumarmen Gläsern noch die Flocken in der Flüssigkeit schwimmen und der Niederschlag spärlich ist.

Alle diese Mischungen werden hierauf centrifugirt, um den Niederschlag am Boden zu sammeln, und die oben schwimmende Flüssigkeit wird decantirt. Diese Flüssigkeit ist in dem Röhrchen 0.1 und 0.5 sehr trübe, nur wenig opalescirend in dem Glase 1.0, und in den übrigen ganz durchsichtig. Die Agglutination ist daher in den beiden ersten unvollständig, vollkommen aber in dem dritten und es ist wahrscheinlich, dass die folgenden einen Ueberschuss von nicht zur Verwendung gelangtem

Serum enthalten. Wenn wir in die Gläser, welche die durchsichtige Flüssigkeit enthalten, einige Oesen Cultur zusetzen und Alles bei 37° in den Brutschrank stellen, sehen wir, dass in den Röhrchen, welche 8·0, 7·0, 6·0^{cem} Serum enthalten, sich rasch ein Niederschlag bildet. In dem Glase, welches 5·0 diluirtes Serum enthält, vollzieht sich die Reaction erst nach Verlauf einiger Stunden. Der Serumüberschuss ist also sehr gering in dieser letzten Mischung.

Wir sehen hier noch einmal, dass eine gewisse Menge von Serum absorbiert wurde, ohne eine wahrnehmbare Wirkung zu erzielen: im Glase, welches 1·0^{cem} Serumdilution enthält, vollzieht sich eine vollständige Agglutination und trotzdem unterscheiden sich jene Gläser, welche eine zwei oder drei und vier Mal so grosse Menge davon enthalten, in Nichts von dem ersten. Die Agglutination ist in allen vollständig und die oben schwimmenden Flüssigkeiten sind gleichfalls durchsichtig und enthalten keine Spur von Serumüberschuss.

Doch wenn man das äussere Ansehen des Niederschlages genau betrachtet, so kann man gleichwohl einen wahrnehmbaren Unterschied zwischen den verschiedenen Bodensätzen beobachten.

Wir wissen jedoch bereits, dass die Zusammensetzungen dieser Niederschläge nicht dieselben sind. Centrifugiren wir und rühren dann die agglomerirten Bodensätze in einigen Cubikcentimetern sterilisirten Wassers ein und centrifugiren von neuem. Die Niederschläge werden zum zweiten Male in 10^{cem} sterilisirten Wassers angerührt und bei 37° in den Brutschrank gestellt. Nach Verlauf einiger Stunden vollzieht sich in Gläsern 4·0 und 3·0 eine Reagglutination, hierauf im Glase 2·0, endlich langsamer im Glase 1·5. In dem Glase 1·0 zeigt sich selbst nach mehreren Tagen nichts. Die verschiedenen Niederschläge sind dieses Mal von verschiedener Grösse. Am grössten in Gläsern 4·0 und 3·0; sie werden stufenweise kleiner und im Glase 1·5 wird der Niederschlag sehr gering und die oben schwimmende Flüssigkeit ist stark getrübt.

So kann man nach einander mehrere Reagglutinationen erhalten in den Mischungen, welche viel Serum enthalten. Wir bemerken, dass die Reagglutinationen stattfinden, ohne dass sich eine Spur von NaCl in der Flüssigkeit aufgelöst findet. Das NaCl, welches nöthig ist, um die Reagglutination hervorzurufen, findet sich im Niederschlag, nicht aber in der Flüssigkeit, was sich im absoluten Widerspruch mit den Resultaten von Bordet¹ befindet, Resultate, auf welche er seine Theorie der Agglutination stützte.

Die Zusammensetzung des Niederschlages ist verschieden je nach

¹ *Annales de l'Institut Pasteur*. 1899. p. 236.

den relativen Proportionen zwischen agglutinirbarer und agglutinirender Substanz, welche er enthält. Das Gemisch, welches das Minimum agglutinirender Substanz verbunden hat (welche wir die Minimalverbindung nennen), ist wenig beständig und zersetzt sich rasch in Wassers.

Diese Zersetzung kommt daher, dass sich ein Theil des zur Verbindung gelangten Salzes in der Flüssigkeit verliert. Es genügt, wie wir schon früher sagten, ihr das entzogene Salz wieder zu geben, um sofort einen Niederschlag sich bilden zu sehen.

Es ist also bewiesen durch unsere vorherigen Experimente:

- 1) dass die Agglutination sich in constanten Proportionen vollzieht;
- 2) dass man verschiedene Verbindungen erzeugen kann je nach den relativen Proportionen der verschiedenen Substanzen, welche man in die Verbindung treten lässt.

Die Minimalverbindung, welche in seinem Molecül die kleinste Quantität agglutinirender Substanz enthält, ist wenig stabil und wird leicht durch Wasser zersetzt.

Die Maximalverbindung, welche das Maximum agglutinirender Substanz enthält, das die agglutinirbare Substanz verbinden kann, ist im Gegentheil sehr stabil und wird durch Wasser schwer zersetzt.

Aus dem Gesagten schliessen wir, dass die Zusammensetzung der specifischen Substanzen mit dem Salz eine wahre chemische Verbindung darstellt.

Die Richtigkeit dieser Ansicht wird noch bekräftigt, wenn wir die Bedingungen, in welche der Agglutinationsvorgang sich vollzieht, genau übersehen. Die Factoren, welche die chemischen Reactionen beeinflussen, beeinflussen auch auf dieselbe Weise die Verbindung der specifischen Mikrobensubstanz mit der specifischen Serumschubstanz und das Salz.

So vollzieht sich z. B. die Vereinigung von den specifischen Substanzen viel rascher in concentrirten als in verdünnten Lösungen. Diese Vereinigung wird durch die Wärme in sehr erheblicher Weise beschleunigt. Wenn wir in zwei Reagensröhrchen dieselben Quantitäten specifischer Substanzen und Salz thun und wenn wir das eine in einer Temperatur von 0° bewahren, das andere in einer Temperatur von 35 bis 40° z. B., ist der Niederschlag vollständig in dem zweiten, während in dem ersten keine Spur von Niederschlag sichtbar ist. Dieselben Erscheinungen charakterisiren die Reactionen der reinen Chemie.

Bis heute ist es nicht gelungen, die specifischen Substanzen in reinem Zustand zu produciren, doch aller Wahrscheinlichkeit nach müssen wir annehmen, dass ihre chemische Activität sehr gering ist.

Andererseits haben wir gesehen, dass sie sich mit einander und mit NaCl in genau begrenzten constanten Proportionen vereinigen, so dass die Gesetze der reinen Chemie auf allen Punkten genau befolgt sind. Auch wenn wir die Bedingungen dieser Verbindung gut studiren und ihre Eigenschaften genau untersuchen, müssen wir bekennen, dass die Vereinigung der specifischen Substanzen und des Salzes mit der Doppelsalzbildung sehr ähnlich ist.

Wir haben gesehen, dass eine gegebene Quantität agglutinirbarer Substanz fähig ist, sich mit einer gegebenen Quantität agglutinirender Substanz und Salz zu verbinden. In anderen Worten: Ein Molecül agglutinirbarer Substanz bindet eine ganz genau bestimmte Menge agglutinirender Substanz und Salz.

Zweitens: Ein Molecül agglutinirbarer Substanz kann sich mit verschiedener Menge agglutinirender Substanz verbinden, um verschiedene Zusammensetzungen zu liefern (Gesetz der multiplen Proportionen).

Die Eigenschaften dieser Producte sind sehr verschieden und hängen von der relativen Menge Substanzen, welche benutzt ist, ab.

Die Verschiedenheit lässt sich erweisen durch das Aussehen des erzeugten Productes (mehr oder weniger schwer oder flockig) und seine Stabilität.

Wenn wir die agglutinirbare Substanz mit T und die agglutinirende Substanz mit S bezeichnen, so hätten wir die Formel TS^n für die stabilste Zusammensetzung (Maximalverbindung), welche am wenigsten specifische mikrobische Substanz und das Maximum agglutinirender Substanz enthält.

Hierauf wären die Formeln für die minderwerthigen Zusammensetzungen TS^{n-x} , TS^{n-2x} , TS^{n-3x} u. s. w., was sich sehr leicht von dem ersten in Abstand bringen lässt.

Die Menge agglutinirender Substanz, welche fähig ist, sich mit der agglutinirbaren Substanz zu verbinden, um die Maximalverbindung zu bilden, ist so vollständig bestimmt, dass, wenn man noch mehr zusetzt, der Ueberschuss unverändert in der Lösung bleibt, und es genügt, die Mischung über einer kleinen Kerze zu filtriren, oder sie energisch zu centrifugiren, um die nicht verbrauchte agglutinirende Substanz in dem Filtrat oder in der oben schwimmenden Flüssigkeit wieder zu finden.

Diese Maximalverbindung ist sehr beständig und besitzt, wie wir soeben gesehen haben, die Eigenschaft, in destillirtem Wasser ohne Hinzufügung von Salz leicht zu reagglutiniren. Dadurch unterscheidet es sich von den Gemischen mittlerer Ordnung, welche sich leichter zersetzen.

Bemerken wir noch, dass man jede beliebige der nicht gesättigte

Verbindung erhalten kann, indem man einer bestimmten Menge Bakterienemulsion eine bestimmte Menge von agglutinirender Substanzlösung beifügt. Eine gegebene Quantität agglutinirbarer Substanz mit einer gegebenen Quantität agglutinirender Substanz und Salz zusammengebracht, ergiebt immer eine bestimmte Verbindung, welche stets die gleiche ist, wenn die relativen Proportionen der Factoren dieselben bleiben.

In dem folgenden Capitel werden wir unserer Ansicht noch befestigen und beweisen, dass die Verbindung der zwei specifischen Substanzen eine wahre chemische ist, da die Eigenschaften der Factoren verschwinden, und dass das erzeugte Product ganz neue Eigenschaften besitzt.

§ II. Das Ergebniss der Verbindung.

Die Bildung eines neuen Körpers.

Man weiss, dass die agglutinirende Substanz durch Erwärmung auf 60° nicht alterirt ist. Die agglutinirbare Substanz des Mikroben erleidet im Gegentheile bei dieser Temperatur eine leichte Modification. Diese Modification zeigt sich besonders darin, dass die Agglutination weniger rasch eintritt, dass es zu ihrem Eintreten einer grösseren Menge Serums bedarf, als zur Agglutination einer lebenden Cultur nöthig ist, und dass der erzeugte Niederschlag minder flockig ist, dass er ein schwereres Aussehen hat.

Wir nehmen eine frische, durch hinreichende Serummenge agglutinierte Cultur, welche centrifugirt wird, um den Niederschlag zu agglomeriren. Nach Decantirung der oben schwimmenden Flüssigkeit wird das Reagensglas sorgfältig mit Filtrirpapier abgewischt und der Bodensatz sodann in 10^{ccm} destillirten Wassers eingerührt. Anstatt jedoch diese Emulsion der gewöhnlichen Temperatur oder bei 37° auszusetzen, erwärmen wir sie auf 60° und sehen dann, dass sich in der Mischung eine Veränderung ergeben hat. In der That hat sich keinerlei Reagglutination gezeigt, und die Flüssigkeit bleibt fortgesetzt trübe.

Vielmehr kann man NaCl der erwärmten Mischung hinzufügen, ohne dass der geringste Niederschlag sich bildet.

Durch die Erwärmung auf 60° wird demnach die Verbindung der mikrobischen Substanz mit der agglutinirenden Substanz stark beeinträchtigt, obwohl die Elemente ihrer Zusammensetzung bei dieser Temperatur keine Veränderung erleiden.

Wir können hier auch beobachten, dass die Widerstandsfähigkeit gegen die Temperatur von 60°, der specifische Niederschlag sehr verschieden, je nach seiner Zusammensetzung, ist. Die Verbindungen, welche

viel agglutinirende Substanz enthalten (Maximalverbindung z. B.), sind viel widerständiger als die anderen. Die Temperatur von 60° muss man länger einwirken lassen, um die Reagglutination durch Beifügung von NaCl zu verhindern. Im Gegentheil sind die Minimalverbindungen leicht zerstört, und um so rascher, je weniger sie agglutinirende Substanz enthalten.

Wenn die Erwärmung nicht lange genug fortgesetzt wurde, so kann es sich ereignen, dass die Zusetzung von NaCl die Bildung eines mehr oder weniger grossen Niederschlages erzeugt. Bemerken wir auch, dass die Bildung dieses Niederschlages sodann durch einen mehr oder minder verlängerten Aufenthalt bei 37° erleichtert wird. Wir konnten beobachten, dass agglutinierte Typhusbacillen in Wasser eingerührt und auf 60° erwärmt bei Zusatz von NaCl selbst nach 24 Stunden Aufenthalt in der gewöhnlichen Temperatur keinen Niederschlag ergeben haben, und dass es manchmal genügte, diese Emulsionen während einiger Zeit bei 37° anzusetzen, um in der Flüssigkeit sich Flocken bilden zu sehen.

Das Ergebniss dieses Experimentes ist, dass in agglutinierten Bacillen sich keine Mischung von specifischen Substanzen und Salz vorfindet (wie es sein müsste, wenn die agglutinirende Substanz die Bacillen imprägnirte nach der Hypothese von Bordet), dass sich aber ein neuer Körper gebildet hat. Durch die Erwärmung auf 60° erleiden die agglutinierten Bacillen eine Veränderung, die isolirte Bacillen noch isolirtes Serum, welche in derselben Weise behandelt werden, nicht erleiden.

Solche Bacillen verhalten sich nicht wie gewöhnliche Bacillen, die dieselbe Temperatur erlitten haben: trotzdem sie eine Menge Serum enthalten, welche genügt, um die normalen, auf 60° erwärmten Bacillen niederzuschlagen, bildet sich selbst bei Zusatz von NaCl keine Agglutination.

Andererseits befindet sich die agglutinirende Substanz in der Mischung nicht in freiem Zustande, was leicht durch Filtration der Flüssigkeit oder durch energisches Centrifugiren nachgewiesen werden kann.

Es kann sich aber auch ereignen, dass die agglutinirende Substanz bei Erwärmung auf 60° nicht in Freiheit gesetzt wird, sondern an die Bakterienzellen gebunden bleibt, so wie dies in den salzfreien Gemischen der Fall ist. In diesem Falle musste das NaCl einen Niederschlag erzeugen, weil die Menge agglutinirender Substanz, welche sich auf den Bakterienleibern gefestigt hat, gross genug ist, um auf 60° erwärmte Bacillen zu agglutiniren.

Diese Versuche beweisen daher, dass die Zusammensetzung, welche sich zu Boden setzt, wenn man die agglutinirende und die agglutinirbare Substanz auf einander einwirken lässt, einen neuen Körper darstellt, welcher in Nichts an die Eigenschaften seiner Grundbestandtheile erinnert. Man kann darin weder die bakterielle noch die agglutinirende Substanz ent-

decken. Diese Körper haben ihre eigene Individualität verloren und sich innig vereinigt, um ein Product von vollkommen neuen Eigenschaften zu ergeben. Der specifische Niederschlag, auf 60° erwärmt, besteht nicht in einer Mischung von Serum und Mikroben, welche diese Temperatur erlitten haben; man kann auf keine Weise die Anwesenheit eines von diesen zwei Elementen beweisen. Die agglutinierten Mikroben, auf diese Temperatur erwärmt, sind ganz verschieden von den normalen, welche auf dieselbe Weise behandelt worden sind. Man sieht, dass ihre Zusammensetzung durch das Verbinden der agglutinirenden Substanzen ganz verändert ist und dass sie eine neue chemische Individualität bilden, welche auch neue Eigenschaften besitzt.

Der agglutinierte Niederschlag erleidet durch Erwärmung eine Umwandlung, welche ihn von seinen Grundbestandtheilen sehr gut differenzirt. Das so erhaltene Product hat die Fähigkeit verloren, sich, selbst wenn es einen Ueberschuss von agglutinirender Substanz enthält, in der physiologischen Kochsalzlösung zu reagglutiniren.

Diese Verbindung agglutinirbarer und agglutinirender Substanz muss demnach als eine wahre chemische Verbindung und nicht als das Ergebnis einer einfachen physikalischen moleculären Bindung angesehen werden.

In diesen Erscheinungen der moleculären Attractionen oder der Porosität werden die Elemente nicht in so inniger Weise mit einander vereinigt. Ihre Einigung giebt nicht einen neuen Körper (im echten Sinne des Wortes), in welchem es unmöglich wäre, seine Constituenten wieder zu erkennen.

Die Vereinigung dieser verschiedenen heterogenen Partikelchen kann eine sehr innige sein, die Kraft, welche sie zusammenhält, kann sehr schwer zu zerstören sein; demnach behält nichtsdestoweniger jedes Partikelchen seine eigene Individualität und der Atomcomplex, welcher aus ihrer Vereinigung entsteht, ist keine neue Verbindung im eigentlichen Sinne.

Ein Umstand könnte unklar erscheinen: Wieso kann eine infinitesimale Dosis Serum eine verhältnissmässig beträchtliche Menge Cultur zum Niederschlag bringen, wenn anders dieser Niederschlag einer chemischen Verbindung zuzuschreiben ist?

Dafür hat man die Agglutinationserscheinung schon mit dem fermentativen Phänomen verglichen, und die agglutinirende Substanz als eine Enzyme angesehen. Doch ist diese Hypothese durch kein Experiment unterstützt. Wir erwidern hierauf, dass diese Verbindung sich zwischen Substanzen vollzieht, welche wir lediglich aus ihren Wirkungen kennen. Wir kennen durchaus nicht die absoluten Mengen, welche thätig werden, und wenn wir sehen, dass ein Serum bei $\frac{1}{50000}$ agglutiniert, so wissen wir doch nicht, welcher Menge activer Substanz dieser Werth entspricht,

noch mit wie viel bakterischer Substanz er sich verbindet. Uebrigens ist es wahrscheinlich, dass jene Substanz, welche wir unter den Namen „agglutinirende Substanz“, „präventive Substanz“, „Agglutinin“, „sensibilisatrice“ u. s. w. bezeichnen, durchaus nicht so einfach ist, als man glauben möchte, und dass sie aus bestimmten Körpern zusammengesetzt ist, welche ihrerseits wieder gegen bestimmte Partien der Mikroben dirigirt werden.

Die mikrobische Emulsion, welche wir den Thieren injiciren, ist kein einfaches, sondern im Gegentheile ein zusammengesetztes Gemisch, und man kann vernünftiger Weise annehmen, dass jedes Element, welches in die Constitution der Bakterienzelle eintritt, in dem Thierorganismus einen specifischen Antikörper bildet. Die Vereinigung dieser Antikörper bildet nun die Substanz, welche wir agglutinirende Substanz nennen. Wenn unsere Untersuchungsmittel vollkommenere geworden sein werden, werden wir ohne Zweifel dazu gelangen, diese Körper zu isoliren und unsere Kenntnisse bezüglich der Natur der Erscheinungen zu erweitern. Dieses Missverhältniss zwischen Ursache und Wirkung ist übrigens nur ein scheinbares. So wie die activen Theile des Serums nur sehr geringfügig sein sollen, muss auch die mikrobische Substanz, mit welcher dieselbe sich einigen kann, gleichfalls nur eine minimale sein. Die active Substanz, im eigentlichen Sinne, des Mikroben stellt nur einen kleinen Theil seiner Masse dar.

Nichts hält uns davon ab, die Agglutinationserscheinung als eine chemische zu betrachten. Es ist durchaus nicht nothwendig, sie der Wirkung einer Diastase zuzuschreiben, und zwar um so weniger, als das Charakteristische dieser Wirkung mangelt, indem wir gezeigt haben, dass sich die Erscheinung unter bestimmt begrenzten Mengen von Substanzen vollzieht.

§ III. Wirkung der anderen Salze als NaCl.

Bisher haben wir bei allen unseren Experimenten Chlornatrium angewandt; es interessirte uns aber auch, zu untersuchen, ob die Eigenschaft, sich mit specifischen Substanzen zu verbinden und so eine niederschlagbare Verbindung zu ergeben, auch von anderen löslichen anorganischen und organischen Salzen getheilt werde.

Im Allgemeinen bewirken die löslichen Salze der schweren Metalle die Bildung eines Niederschlages, welcher in Vielem dem durch specifisches Serum erhaltenen Niederschlage gleicht.

Die Haloidsalze des Zink, Cadmium, Eisen, Kupfers, Gold, Platin u. s. w.,

die verschiedenen Alaune, die löslichen Blei-, Uran-, Aluminiumsalze u. s. w. besitzen diese Eigenschaft in hohem Grade.

Die Salze der Alkali- und der Erdalkalimetalle erzeugen im Allgemeinen in den Emulsionen von Typhusbacillen keine Niederschläge, wenn diese nicht früher mit agglutinirender Substanz imprägnirt worden sind. Doch finden wir einige Alkalisalze, welche ohne Serum eine Agglutination hervorrufen können, wie z. B. SO_3HK , SO_4HK , SO_4HNa , PO_4HNa_2 u. s. w.

Um die Rolle zu studiren, welche die verschiedenen löslichen Salze spielen, haben wir vorerst eine mikrobische Emulsion und eine Serumlösung präparirt, welche beide mittels Dialyse vollständig jeden Salzgehaltes beraubt wurden.

Wir setzen nun in eine Reihe von Reagensgläsern eine gleiche Menge Emulsion und exact gleiche Dosen von verschiedenen Salzen, welche Dosis für alle in trockener Substanz berechnet worden ist (ohne Krystallwasser).

Hierauf setzten wir in jedes Glas eine Menge Serum, welche in den Emulsionen zu 0·7 Procent NaCl nur eine langsame Agglutination erzeugt. Die angewandte Menge der verschiedenen Salze war gleichfalls sehr geringfügig und entsprach für ein jedes 0·005 bis 0·01 reiner Substanz in 10^{cem} Wasser. Wir konnten nun wahrnehmen, dass die meisten löslichen Alkali- oder Erdalkalisalze die Verbindung der agglutinirenden mit der agglutininbaren Substanz hervorrufen und eine ausfällbare Verbindung ergeben können.

Die chemisch activen Salze, wie Hydroxyde oder Carbonate, hindern die Bildung des Niederschlages. Die Lösungen, welche 0·01 bis 0·02 NaOH oder KOH in 10^{cem} enthalten, lassen gar keinen Niederschlag zur Bildung gelangen. Selbst wenn man diesen Lösungen NaCl zusetzt, bildet sich der Niederschlag nur schwer und oft gar nicht, nämlich wenn das Mengenverhältniss der agglutinirenden Substanz wenig beträchtlich ist. Man darf aber nicht etwa glauben, dass es sich hier um eine Zerstörung der agglutinirenden oder agglutininbaren Substanz durch die Alkalien handelt. Diese Substanzen werden in Nichts alterirt, und es genügt, wenn man die Mischung durch eine Säure neutralisirt, um die Agglutination sofort eintreten zu sehen.

Unter den Salzen einer und derselben Reihe (Chlorid, Bromid, Jodid z. B.) kann man einige Unterschiede wahrnehmen. Im Allgemeinen vollzieht sich die Agglutination in den Chloridlösungen rascher, als in denen des Bromid oder Jodid.

Das Salz scheint auf die specifischen Substanzen durch seine Säure radical zu wirken. Die Verschiedenheiten, welche man zwischen den nämlichen Salzen zweier verschiedener Metalle wahrnehmen kann, sind gleich Null. Wenn wir z. B. die Haloidsalze des Kalium mit denen des

Natrium oder Ammonium vergleichen, so finden wir zwischen diesen Verbindungen keinerlei Unterschied. Das Chlornatrium erzeugt die Agglutination ebenso schnell und in derselben Weise, wie das KCl oder NH_4Cl . Dasselbe gilt für NaBr, KBr und NH_4Br , NaJo, KJo und NH_4Jo .

Auch bei den Sauerstoffsalzen nimmt man keinen Unterschied wahr: SO_4K_2 , SO_4Na_2 und $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ haben in derselben Zeit wahrnehmbar dieselbe Wirkung. Die Nitrate, Phosphate u. s. w. befinden sich gleichfalls in derselben Lage.

Wenn wir jedoch die Salze einer und derselben Basis mit verschiedenen Säuren radical betrachten, so sehen wir sofort eine Verschiedenheit in dem Gange der Erscheinung. Je nach der Natur der Säure vollzieht sich der Niederschlag mehr oder weniger rasch und dicht. Bei den einen bilden sich grosse Flocken, welche sich schnell absetzen; bei den anderen dagegen bilden sich feine Gerinnsel, welche lange in Schwebelage bleiben, bevor sie den Grund des Glases erreichen. Auch der äussere Anblick des Niederschlages ist ein verschiedener, flockig, umfangreich, leicht bei den einen, ist er compact und so zu sagen pulverig bei den anderen.

Wir gedenken unsere Untersuchungen auf diesem Wege fortzusetzen, um die Natur der Verbindung der specifischen Substanzen noch genauer festzustellen und selbst auf die Zusammensetzung dieser Substanz etwas Licht zu werfen.

Der Inhalt dieser Abtheilung lässt sich leicht in einigen Worten zusammenfassen:

1. Die Vereinigung der specifischen Substanzen (agglutinirbare und agglutinirende Substanz) mit dem Salze muss als eine wahre chemische Verbindung betrachtet werden.

2. Diese Verbindung vollzieht sich in ganz genauen Proportionen und folgt also dem Gesetze der constanten Proportionen.

3. Die specifischen Substanzen und das Salz können sich in verschiedenen Proportionen vereinigen, um verschiedene Producte zu liefern.

4. Die verschiedenen Zusammensetzungen lassen sich leicht charakterisiren durch das Aussehen der erzeugten Producte (mehr oder weniger flockig und schwer) und durch ihre Stabilität.

Die Maximal-Verbindungen liefern leicht bei Zusetzung von agglutinirbarer Substanz minderwerthige Zusammensetzungen.

5. Die Erscheinung ist ähnlich der, welche die Erzeugung von Doppelsalzen begleitet.

6. Wie in der reinen Chemie kann man die bakterielle Emulsion durch fraktionirtes Niederschlagen ganz absetzen. Um eine gegebene Menge Bakterienzellen niederzuschlagen, muss eine genau bestimmte Menge

Serumlösung (welche auch eine genau bestimmte, immer gleiche Menge agglutinirender Substanz enthält) benützt werden, und diese Quantität bleibt immer dieselbe, ob die Serummenge auf ein Mal oder in mehreren Fraktionen (um einen fraktionirten Niederschlag zu erzeugen) beigelegt wurde.

7. Die chemische Natur des Agglutinationsvorganges präcisirt sich noch besser, wenn man beobachtet, dass der erzeugte Niederschlag nicht aus einer Mischung der specifischen Substanzen besteht, sondern durch einen neugebildeten Körper formirt ist.

Wenn man diesen specifischen Niederschlag auf 60° erwärmt, kann man sich leicht überzeugen, dass er aus keinem einfachen Gemisch von agglutinirbarer und agglutinirender Substanz besteht. In der That besitzt die Mischung nach der Erwärmung die Eigenschaften der auf 60° erwärmten Mikroben und des Serums nicht, aber sie enthält einen Körper, welcher sich von der ersten leicht unterscheiden lässt. Dieser neue Körper wird durch NaCl nicht reagglutinirt, selbst wenn er eine Menge Serum enthält, welche die auf 60° erwärmten frischen Bacillen leicht agglutinirt.

8. Eine grosse Reihe löslicher Salze können die Verbindung der specifischen Substanzen hervorrufen.

9. Die Eigenschaften der erzeugten Verbindungen scheinen von den Säurenradicalen der Salze beeinflusst zu sein. Die Salze, welche von derselben Säure herkommen, haben dieselben Eigenschaften, ungeachtet sie durch verschiedene Metalle formirt sind.

Umgekehrt wirken die Salze von einem und demselben Metalle sehr verschieden, wenn ihre Säure radical verschieden ist.

§ IV. Die verschiedenen Agglutinationstheorien.

Als Schluss wollen wir einen raschen Ueberblick über die verschiedenen Theorien geben, welche behufs Erklärung der Agglutinationserscheinung aufgestellt worden sind. Dabei können wir constatiren, dass die meisten dieser Theorien reine Hypothesen sind und sich im Allgemeinen auf gar keine genaue Untersuchung gründen. Nothwendiger Weise befassen wir uns mit der Untersuchung der Theorien von Gruber, Pfeiffer, Palt-auf, Nicolle und Bordet.

Die Theorie Gruber's. In seiner ursprünglichen Theorie schrieb Gruber der organischen Natur der Mikroben eine ganz besondere Wichtigkeit zu. Unter der Einwirkung des specifischen Serums erleidet ihre Membrane eine Aufquellung und wird klebrig. Dadurch erklärt es sich, dass die Mikroben, welche von der specifischen Substanz berührt wurden,

sich dicht zusammenschliessen und durch diese klebrige Substanz zusammengehalten bleiben. Gruber nannte die Substanz, welche diese Veränderung der bakterischen Membrane hervorruft, „Glabrificin“. Dieses Glabrificin wird im Acte der Agglutination gebunden oder aber zerstört, denn es ist nachher nicht mehr auffindbar; daher ist nach diesem Autor die Action des agglutinirenden Serums ganz proportionell der angewandten Menge.

Diese Hypothese begegnete sofort vieler Opposition, und Gruber überzeugte sich selbst von ihrer Unzulänglichkeit. Deshalb hat er sie kürzlich modificirt. In seiner neuen Theorie lässt Gruber noch immer gelten, dass das Zusammentreten der Mikroben der Bildung einer klebrigen Substanz zuzuschreiben sei, doch rühre diese Klebrigkeit nicht von einer Aufquellung der Membrane her. Er beobachtete, dass die Hofbildung an den Rändern der Bakterien, welche er ursprünglich bei den agglutinierten Mikroben wahrgenommen hatte (welche Erscheinung ihn zur Aufstellung seiner ersten Theorie geführt hatte), nicht constant war, sondern dass dieselbe auch häufig an der Aussenseite normaler, nicht agglutinierter Mikroben wahrgenommen werden konnte. So behauptet Gruber heute, seine ursprüngliche Theorie modificirend und unter Aufrechterhaltung seiner Ansicht über den Bestand einer klebrigen Substanz, dass die Agglutination einer Veränderung zuzuschreiben ist, welche sich entweder im Protoplasma oder in der Membran des Mikroben vollzieht. Es ist wahrscheinlich, sagt er, dass in der Bakterienmembran gewisse Substanzen unlöslich geworden sind und durch ihre Retraction und Ausscheidung auf der Oberfläche kleine, klebrige Asperitäten bilden, durch welche die Mikroben stark an einander geklebt werden, sobald sie sich berührt haben.

Die Theorie Pfeiffer's. Pfeiffer ist der Ansicht, dass sich die Agglutinationserscheinung auf eine Immobilisation oder vielmehr auf eine Paralyisirung der Mikroben zurückführt, welche von der specifischen Serumsubstanz berührt wurden; diese Immobilisation sei stets von einem Aufhören in ihrer Entwicklung begleitet. Die Substanz, welche diese Erscheinung hervorruft, sei absolut verschieden von derjenigen, welche eine analoge Erscheinung in der Bauchhöhle erzeugt, und um sie von der letzteren zu unterscheiden, hat ihr Pfeiffer den Namen „specifische Paralysine“ gegeben.

Die Theorie Paltauf's. Paltauf behauptet, dass die Agglutination der Mikroben in Suspension der Bildung eines Niederschlages zuzuschreiben ist, welcher in der Flüssigkeit entsteht und die Mikroben an sich heranzieht.

Diese Hypothese basirte sich auf einen ziemlich merkwürdigen Versuch Kraus': Wenn man der filtrirten, aus einer alten z. B. Typhus-

oder Choleraeultur stammenden Flüssigkeit eine gewisse Menge specifischen Serums beisetzt, so bildet sich in ihr ein flockiger Niederschlag, welcher vollständig an jenen Niederschlag erinnert, den man bei der Agglutination der Mikroben durch die homologen Sera findet.

Die agglutinirbare Substanz der Bakterien löst sich in der umgebenden Flüssigkeit auf und wird daselbst durch die specifische Substanz des entsprechenden Serums zum Niederschlage gebracht.

Die Theorie Nicolle's. Diese Theorie bildet gewissermaassen das Bindeglied zwischen denjenigen von Paltauf und Gruber. Nach Nicolle befindet sich die agglutinirbare Substanz (*substance agglutinée*), welche den Niederschlag von Kraus liefert, in den Membranen und an der Aussenseite der Mikroben verbreitet. Unter der Einwirkung des Agglutinin schwillt diese peripherische Schicht an, wird sichtbar und klebt sich an die äussere Hülle der umgebenden Individuen. Nach dieser Theorie beruht demnach die Agglutination darauf, dass sich der Kraus'sche Niederschlag in der peripherischen Schicht der Mikroben bildet und die Eigenschaft besitzt, dieselbe dabei klebrig zu machen.

Die Theorie Dineur's. Dieser Autor schreibt dem Vorhandensein der Geisseln eine grosse Wichtigkeit zu, ohne zu bedenken, dass auch unbewegliche, dieser Organe vollständig beraubte Mikroben, und selbst Zellen, wie die rothen und weissen Blutkörperchen, sich unter der Einwirkung der specifischen Sera vollständig agglutiniren. Diese Theorie erkennt, wie diejenige von Gruber und Nicolle, das Vorhandensein einer klebrigen Substanz an, doch hier bildet sich diese Substanz speciell auf den Geisseln, welche sich an einander kleben, in ihre Nachbarindividuen verfilzen und endlich einen unentwirrbaren Knäuel bilden.

Die Theorie Bordet's. Seit 1896 wollte Bordet in der Agglutinationserscheinung lediglich eine einfache physikalische Erscheinung erblicken, bei welcher die Mikroben nur eine passive Rolle spielen. Ihre Vitalität komme dabei nicht in Frage, da sich auch todte Mikroben agglutiniren lassen. Die Rolle der activen Serums substanz bestehe darin, dass sie in dem Mikroben Modificationen herbeiführt, welche ihn vollständig einem inerten Partikelchen vergleichbar machen, das sich in einer Flüssigkeit in Suspension befindet.

Im Jahre 1899 nahm Bordet diese Theorie wieder auf und zeigte die Rolle, welche die Anwesenheit der Salze in der Agglutinationserscheinung spielt. Der Mikrob, welcher von der specifischen Serums substanz berührt wurde, befindet sich in derselben Lage, wie die inerten Partikelchen z. B. des Thones, welche man im Wasser in Suspension bringt. Diese können

auch unendlich oder doch sehr lange in Suspension bleiben, ohne sich abzusetzen; es genügt aber, wenn man der Lösung ein wenig Salz beifügt, um in dem einen wie anderen Falle Flocken sich bilden zu sehen, welche rasch auf den Boden der Tube absetzen.

Diese beiden Erscheinungen, Agglutination von Mikroben und Agglutination von Thonpartikelchen, stehen sich demnach, wenn sie nicht identisch sind, sehr nahe, und Bordet definirt die Agglutination wie folgt: Sie ist die Anhäufung ursprünglich zerstreuter organischer Partikelchen, welche unter dem Eindrucke eines besonderen Einflusses stehen, und deren moleculäre Adhäsionseigenschaften geändert sind.

Diese Definition kommt derjenigen sehr nahe, welche Duclaux gegeben hat, um die Coagulationserscheinung zu erklären. Auch diese sei einer Gleichgewichtsveränderung unter den moleculären Kräften zuzuschreiben, welche sich in der Mischung vorfinden und die Partikelchen in Schwebelage erhalten.

Bordet folgt in dieser Frage den Hypothesen von Duclaux und betrachtet die Agglutination als eine Coagulationserscheinung und schlägt vor, den der activen Serums substanz gegebenen Namen „Agglutinin“ in „Coagulin“ umzutauschen. Nach dieser Hypothese kann man das Phänomen der Agglutination in letzter Analyse in zwei sehr verschiedene Phasen getheilt sehen. In der ersten fixirt sich das specifische Agglutinin auf den Mikroben und modificirt dann die moleculären Attractionsverhältnisse, welche zwischen den mikrobischen Partikelchen und der umgebenden Flüssigkeit bestehen. Die organisirte Natur des Mikroben tritt in der ersten Phase wohl in Thätigkeit, aber sie geht nicht weiter. Ist das Mikrob einmal von dem Agglutinin berührt, so hat seine eigene Organisation weiter keine Bedeutung mehr, sie verschwindet vollständig, und das einem anorganischen Partikel identisch gewordene Mikrob wird nun den Gesetzen der Coagulation folgen, welche die zweite Phase der Erscheinung bildet.

Zur Unterstützung seiner Hypothese führt Bordet den folgenden Versuch an.

Cholera vibrien sind mittels Choleraserum agglutiniert worden. Sobald der Niederschlag gebildet ist, centrifugirt man, und giesst die klare, oben schwimmende Flüssigkeit ab. Hierauf werden die Mikroben im Wasser eingerührt und in zwei Tuben vertheilt. Man füllt die erste mit destillirtem Wasser voll, die zweite mit physiologischer Kochsalzlösung; hierauf centrifugirt man neuerdings. Wenn die Niederschläge gebildet sind, so giesst man die oben schwimmenden Flüssigkeiten ab und ersetzt sie durch gleiche Flüssigkeiten: durch Wasser in der ersten und physiologische Lösung in der zweiten Tube. Man constatirt hierauf, dass sich die Mikroben in der Tube, welche Wasser enthält, nicht mehr reaggluti-

niren, in derjenigen, welche NaCl enthält, bilden sich rasch Flocken. Um endlich die Agglutination in der Tube, welche die im Wasser eingerührten Bacillen enthält, wieder eintreten zu lassen, genügt es, 0.07 Procent NaCl beizusetzen.

Durch diesen Versuch scheint demnach die Rolle des NaCl besonders dargethan zu sein: die mit specifischer Serumssubstanz imprägnirten Mikroben, welche solcher Art wahre inerte Partikelchen geworden sind, agglutiniren sich so lange nicht, als das moleculäre Gleichgewicht, welches sie in der Flüssigkeit in Schwebelage erhält, nicht durch das Vorhandensein dieses Salzes modificirt wird.

Wenn man diese verschiedenen Hypothesen überblickt, so zeigt es sich, dass darunter solche sind, welche auch nicht einmal einer sehr oberflächlichen Prüfung standhalten. So z. B. die Hypothese Dineur's, welcher dem Vorhandensein der Geißeln besondere Wichtigkeit beimisst. Wir wissen thatsächlich, dass unbewegliche Mikroben, welche dieser Anhängsel ganz beraubt sind, unter der Einwirkung specifischer Sera vollständig agglutinirt werden können; celluläre Elemente, wie z. B. Blutkörperchen, agglutiniren sich gleichfalls unter der Einwirkung homologer Sera (Bordet). Wenn man endlich agglutinierte Mikroben (z. B. Typhusbacillen) nach einer der Methoden der Geißelfärbung färbt (die Methode Zettnow's hat uns die besten Resultate ergeben), so sieht man, dass diese Organe keinerlei Art von Degeneration erlitten haben, und man kann sie nicht von den entsprechenden Organen unagglutintirter Mikroben unterscheiden.

Die Theorien, die als Ursachen der Agglutinationserscheinung die Bildung klebriger Substanzen auf der Oberfläche der Mikroben annehmen, welche die Adhärenz der Bakterien unter einander bedingen, lassen sich nicht experimental nachweisen und haben auch sonst keine Wahrscheinlichkeit für sich. Es ist unmöglich, auch nur die geringste Modification in der Form oder im Anblicke der agglutinierten Mikroben darzuthun. Wenn man sie aber färbt, so sieht man sehr bald, dass sie nicht mittels einer klebrigen Substanz an einander gehalten werden; ihre Ränder sind wohl abgegrenzt und nichts unterscheidet sie von nicht agglutinierten Mikroben. Es ist klar, dass, wenn sich eine klebrige Substanz auf ihrer Oberfläche befände, die Ränder eine diffuse Färbung annehmen würden, und dass ihre Berührungslinien dort, wo die Bakterien sich treffen, nicht deutliche Winkel, sondern Verteilungen bilden würden.

In seiner zweiten Hypothese behauptet Gruber zwar, dass die Agglutination der Mikroben auf die Bildung klebriger Punkte auf ihrer Ober-

fläche, und nicht auf eine Degenerescenz oder Coalescenz ihrer äusseren Schichte zurückzuführen sei. Diese neue Art zu sehen, erklärt den inneren Zusammenhang der Erscheinung auch nicht deutlicher. Warum localisirten sich diese klebrigen Protuberanzen lediglich auf der Oberfläche und warum thun selbst die feinsten Färbungsmethoden nicht ihre Anwesenheit dar? Und wie kann weiter das Vorhandensein klebriger Substanzen auf der Oberfläche der Mikroben dieselben veranlassen, sich in Haufen zu agglutiniren? Man kann zur Noth zulassen, dass, wenn bewegliche Bakterien, welche eine klebrige Oberfläche bieten, sich an einander heften, wenn sie sich bei ihren beständigen Bewegungen berühren, doch ist es weniger verständlich, dass vollkommen unbewegliche Bakterien oder todte Bacillen sich an einander heften sollen, weil sich klebrige Substanzen an ihrer Oberfläche gebildet haben.

Man müsste, um diese Hypothese zu erklären, annehmen, dass bei den der Beweglichkeit beraubten Organismen die Bildung der klebrigen Substanz von einer anderen Erscheinung begleitet wird: der Bildung von Attractionscentren, welche die klebrig gewordenen Mikroben gegen einen Punkt convergiren lassen.

Dieselben Einwürfe richten sich auch gegen die Theorie Nicolle's, welcher gleichfalls annimmt, dass die Agglutination der Coalescenz den äusseren Schichten der Mikroben zuzuschreiben sei.

Zum Nachweise der Unzulänglichkeit der Theorie Pfeiffer's genügt es anzuführen, dass sich auch unbewegliche oder getödtete Mikroben sehr gut agglutiniren. Es ist daher unnütz, paralysirende, oder solche Substanzen eintreten zu lassen, welche die vitalen Eigenschaften der Mikroben angreifen.

Nur zwei von allen vorgeschlagenen Theorien scheinen eine glaubwürdige Erklärung des Agglutinationsphänomens zu geben. Dies sind die Theorien von Bordet und von Paltauf (welcher sich diejenige Nicolle's anreihet).

Wie bekannt, schreibt die Theorie Paltauf's die Erscheinung der Bildung eines extrabakterischen Niederschlages (des Kraus'schen Niederschlages) zu, welcher die in der Flüssigkeit in Schwebe befindlichen Mikroben an sich zieht.

Wenn man die Bedingungen, unter welchen sich dieser Niederschlag bildet, näher besieht, so sieht man sehr bald, dass er nicht als Grundlage für eine Agglutinationstheorie dienen kann.

Erstens bildet er sich sehr langsam und nur unter der Wirkung ausgiebiger Dosen von Serum, wie man solche niemals zur Agglutination der Mikroben anwendet.

So erhalten wir, wenn wir einer 40 Tage alten und durch die Kerze filtrirten Typhuscultur $\frac{1}{10}$ actives Serum von Werth $\frac{1}{15000}$ z. B. beisetzen, einen Niederschlag erst nach 12 bis 15 Stunden, und auch da ist derselbe sehr schwach. Wir haben noch bei Zusetzung von $\frac{1}{20}$ und selbst von $\frac{1}{25}$ von activem Serum einen Niederschlag erhalten, niemals aber bei einer stärkeren Verdünnung.

Kann daher dieser so schwer erhältliche und so schwache Niederschlag die Bakterien mit sich ziehen, und sollten diese eine gänzlich passive Rolle spielen?

Zweitens zieht dieser Niederschlag die Partikelchen, welche sich in der Flüssigkeit, wo er sich vollzieht, in Schwebe befinden, nicht nothwendigerweise mit sich. Wir konnten häufig beobachten, dass, wenn wir einer filtrirten alten Typhuscultur eine Coli- oder Cholera-Emulsion und hierauf eine genügende Menge von Typhusserum beifügen, ein Niederschlag sich bildet, welcher nur eine äusserst geringfügige Menge von Coli oder Cholera mit sich gerissen hat.

Bezüglich der Natur des Niederschlages nimmt Paltauf an, wie es übrigens auch Nicolle thut, dass er dem Vorhandensein einer gewissen Menge aufgelöster bakteriischer Substanz in der filtrirten Flüssigkeit zuzuschreiben ist. Diese Substanz wird unter der Einwirkung specifischen Serums klebrig und unlöslich. Wir müssen indess bemerken, dass die Bildung eines Niederschlages in den filtrirten Culturen keineswegs constant ist, und dass sie häufig selbst bei den alten Culturen ausbleibt.

Man kann gegen diese Theorie auch noch einen anderen Einwand erheben. Welche Menge Serum man immer einer filtrirten jungen (z. B.) Typhuscultur (von 24 oder 48 Stunden) zusetzt, so bildet sich doch niemals ein Niederschlag. Doch wissen wir, dass man die Agglutinationserscheinung auch in den frischen Culturen hervorrufen kann.

Die Hypothese Nicolle's will diese Anomalie erklären. In derselben findet man in der That die Paltauf'sche Theorie etwas fortentwickelt wieder. Nicolle nimmt gleichfalls an, dass die Agglutinationserscheinung der Bildung des Kraus'schen Niederschlages zuzuschreiben sei, doch soll sich derselbe nicht ausschliesslich in der umgebenden Flüssigkeit erzeugen. Er kann in der mikrobischen Hülle entstehen und daselbst eine klebrige Substanz erzeugen. Die agglutinirbare Substanz, welche sich in den filtrirten alten Culturen findet (Nicolle nennt sie: Substance agglutinée), ist einfach in der Membrane des Mikroben eingeschlossen und sie verbreitet sich nur langsam in der umgebenden Flüssigkeit. Diese Substanz schlägt sich unter der Wirkung der specifischen Serums substanz nieder

und erzeugt dabei das Aufquellen und die klebrige Degenerescenz der Membrane.

Hier findet sich demnach eine Verbindung der Theorien Paltauf's und Gruber's. Alle Einwürfe, welche gegen die letztere erhoben worden sind, richten sich daher auch gegen die Theorie Nicolle's.

Der erste Theil dieser Theorie, welcher die Bildung des Kraus'schen Niederschlages im Inneren der mikrobischen Hülle in's Auge fasst, giebt ihr einen Anstrich von Exactheit und könnte bis zu einem gewissen Punkte eine Erklärung der Agglutinationserscheinung bieten. Man könnte auch ganz gut annehmen, dass, obgleich die Bildung des Kraus'schen Niederschlages nur sehr langsam erfolgt, der Niederschlag der Bakterien doch rasch vor sich geht, weil sich in dem Bakterienkörper die agglutinirbare Substanz in einem sehr concentrirten Zustande befindet. Die unlösliche Verbindung, welche sich in den filtrirten Culturen so langsam bildet, tritt hier sofort und in grosser Menge auf, und diese Erklärung giebt besser als die Paltauf's eine Begründung für die Erscheinung und erklärt die Agglutination der jungen Culturen.

Die agglutinirbare Substanz befindet sich in der That schon in der Membrane des Mikroben eingeschlossen, lange bevor auch nur eine geringe Spur in den flüssigen Nährboden gedrungen ist; daher agglutiniren sich junge Culturen vollständig, während die Flüssigkeiten, in welchen sie sich entwickelt haben, keinerlei Niederschlag unter der Wirkung des specifischen Serums zur Bildung gelangen lassen. Diese Theorie Nicolle's erscheint demnach im ersten Augenblicke ziemlich wahrscheinlich. Sie will jedoch zuviel erklären und verliert dabei von ihrer Wahrscheinlichkeit. In seinem Bestreben, den Grund der Zusammenhäufung der agglutimirten Mikroben anzugeben, gelangte Nicolle zur Annahme einer klebrigen Substanz, welche Hypothese in allen angestellten Experimenten als unrichtig befunden wurde.

Die Theorie Bordet's ist interessant, aber durch keine genauen Experimente bewiesen. Selbst wenn man ihr Exactheit zusprechen will, kann man ihr doch nicht den Vorwurf einer beträchtlichen Lücke ersparen. In der That erklärt Bordet, indem er die Erscheinung einer physikalischen Ursache, einer gewaltsamen Verschiebung des moleculären Gleichgewichts zuschreibt, welche zwischen den Bakterien und der umgebenden Flüssigkeit besteht, schliesslich nur den zweiten Theil der Erscheinung, nämlich den Niederschlag der mit specifischem Serum imprägnirten Bakterien. Bezüglich des interessantesten Theiles, jenes, wo das Serum direct auf den Mikroben einwirkt und ihn in leblose inerte Moleküle verwandelt, sagt uns Bordet kein Wort.

Diese Theorie wird übrigens durch kein einziges beweisendes Experiment unterstützt und kann in die Kategorie der unerweislichen Hypothesen eingereiht werden. Das einzige Experiment, welches der Autor anführt, und dessen wir vorhin Erwähnung gethan haben, ist, wie wir im Laufe dieser Abhandlung gezeigt haben, ungenügend, da wir beweisen, dass es möglich ist, dieselbe Reagglutinationserscheinung in absolut salzfreien Lösungen zu erhalten.

Bei allen vorgeschlagenen Theorien lässt man im Allgemeinen nur zwei Factoren zu, um die Agglutinationserscheinung zu erklären: die specifischen Substanzen der Mikroben und Serum. Bordet allein lässt noch einen dritten Factor auftreten, welchem er eine passive Rolle anweist, das Salz.

Wie wir bereits gesagt haben, reducirt sich seine Theorie auf eine einfache Hypothese. Er unterstützt seine Ansicht durch keinen einzigen Versuch. Ueberdies begeht er eine bedauerliche Verwechslung zweier absolut verschiedener Erscheinungen: der Agglutination und der Reagglutination. Der Versuch, dessen er Erwähnung thut, und auf welchen er seine ganze Theorie baut, beweist in Wirklichkeit nur Eines: dass sich die Reagglutination leichter vollzieht, wenn Salz vorhanden ist. Es ist übrigens in der Chemie wohl bekannt, dass das Vorhandensein von Salzen in einer Lösung die Bildung gewisser Niederschläge begünstigt. Aber von da her zu schliessen, dass in der Frage, die uns beschäftigt, die Rolle des Salzes eine rein passive sei, ist es noch weit hin. Wir haben gezeigt, dass sich die Agglutination der Mikroben leicht in salzfreien Flüssigkeiten vollzieht, und dass es in Folge dessen überflüssig sei, die Wirkung physikalischer Kräfte anzunehmen, um die Agglutinationserscheinung zu erklären. Die Anwesenheit des Salzes ist unerlässlich, doch ist seine Dazwischenkunft keine passive. Diese Thatfachen werden im ersten Theile dieser Abhandlung ausreichend bewiesen.

Wir sagten vorhin, dass Bordet zwei bestimmte Erscheinungen verwechselt, die Agglutination und die Reagglutination. Sie sind indessen sehr verschieden geartet und sollten keinesfalls mit einander verwechselt werden.

Die Agglutination ist der Act, in welchem sich die specifischen Substanzen mit dem Salze verbinden, um ein ausfällbares Gemisch zu ergeben. Sie kann in zwei Phasen getheilt werden: Die erste verdankt ihre Entstehung einer chemischen Verbindung (nicht aber einer „Sensibilisation“) zwischen den specifischen Substanzen der Mikroben und dem Serum und dem Salze. Die zweite Phase, welche allein mit der Reagglutination identisch ist, charakterisirt sich durch die Niederschlagung der in der ersten Phasen formirten Verbindung.

Die Reagglutination vollzieht sich, wenn bereits agglutinierte Mikroben sich neuerdings niederschlagen, nachdem sie in einer Flüssigkeit gerührt worden sind. Sie kann hervorgerufen werden selbst wenn die Flüssigkeit, in welcher die Bakterien schweben, kein Salz enthält.

Bordet hat gezeigt, dass sich die Reagglutination unter gewissen Voraussetzungen nur dann vollzieht, wenn sich in der Flüssigkeit NaCl in Auflösung befindet. Indem er aber hieraus den Schluss gezogen hat, dass die Erscheinung der Agglutination einer physikalischen Ursache zuzuschreiben sei, ist er wohl ein wenig zu weit gegangen, denn selbst angenommen, dass sein Versuch richtig wäre, so könnte er daraus doch nur immer Eines folgern: dass die Reagglutination und die zweite Phase der Agglutination als wahre Erscheinungen der Sedimentation anzusehen sind.

Unsere Erfahrungen stehen daher im directen Gegensatz mit den Ideen Bordet's und erheben sich wider die physikalische Theorie der Agglutination.

Schlussfolgerungen.

Aus unserem Experiment über den Mechanismus der Agglutination lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Die mit agglutinirbarer Substanz zusammengebrachte agglutinirende Substanz wird durch die erstere gebunden, ohne dass eine makroskopische oder mikroskopische Veränderung diese Bindung kennzeichnet. Die solcher Art modificirten Mikroben bleiben lebend, frei und beweglich.

2. Die Einführung einer Spur von Salz in die Mischung ruft sofortige Agglutination hervor.

3. Das Volum des erhaltenen Niederschlages steht im Verhältniss zur Menge des zugesetzten Salzes und der zugesetzten Serummenge.

4. Die Rolle des Salzes ist keine passive, wie Bordet glaubt; das Salz wirkt activ und tritt in die Verbindung der agglutinirbaren mit der agglutinirenden Substanz ein.

5. Man kann selbst in einer salzfreien Flüssigkeit eine charakteristische Agglutination erhalten, wenn die Bakterien salzhaltig sind.

6. Die Verbindung zwischen den specifischen Substanzen und dem Salze muss als eine chemische Erscheinung angesehen werden, weil zwischen der relativen Menge der drei in die Verbindung eintretenden Substanzen eine enge und constante Beziehung besteht.

7. Die Verbindung kann sich unter diesen drei Substanzen in mehreren Proportionen vollziehen und so verschiedene Verbindungen ergeben.

8. Die so gebildete Verbindung ist ein neuer Körper, dessen Eigenschaften ganz verschieden sind von denjenigen, welche die Körper, von denen er her stammt, charakterisiren.

9. Bei der Agglutinationserscheinung ist eine grosse Anzahl anderer Salze an Stelle des Chlornatriums anwendbar.

10. Je nach der Natur des Salzes vollzieht sich die Erscheinung mehr oder weniger energisch.

11. Die Theorien, nach welchen die Agglutination einem Aufquellen der Hülle der Mikroben zuzuschreiben ist, oder welche auf die Aenderung ihrer Vitalität gestützt sind, müssen verlassen werden.

Die anderen Theorien, welche in der Agglutination eine intra- oder extracelluläre Niederschlagbildung mit Aufquellung der Bakterienhülle ansehen, sind nicht bewiesen und werden durch kein Experiment unterstützt.

Die physikalische Theorie, welche die Niederschlagung der Mikroben durch spezifisches Serum den zusammentreffenden physikalischen Kräften zuschreibt, ist gleichfalls durch kein Experiment unterstützt.

12. Nach unseren Experimenten hat die Agglutinationserscheinung durch die chemische Bindung drei Substanzen hervorgerufen. Diese drei Substanzen sind: die spezifische agglutinirbare Substanz der Bakterien, die spezifische agglutinirende Substanz des Serums, und das Salz.

Die Agglutinationserscheinung ist der Bildung der Doppelsalze sehr ähnlich.
