[Aus dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.]
(Director: Geh. Med.-Rath Prof. Dr. R. Koch.)

Ueber Agglutinine und Präcipitine.

Von

A. Wassermann.

In der vorliegenden Arbeit soll über eine Reihe von Versuchen berichtet werden, die ich im Laufe des Winters 1901/02 über das Wesen der von Gruber und Durham entdeckten Agglutinine angestellt habe. Manche der dabei erhaltenen Resultate sind inzwischen von anderen Autoren veröffentlicht worden, so dass die Arbeit in einer Reihe von Punkten nur eine Bestätigung oder Erweiterung der schon bekannten Befunde enthält.

I. Constitution der Agglutinine.

Nach Ehrlich's Seitenkettentheorie muss jede Substanz, welche beim Immunisirungsvorgang zum Auftreten specifischer Körper im Serum führt, specifische Bindungsgruppen besitzen, und umgekehrt muss der im Serum auftretende Körper die specifische Gegengruppe aufweisen. Diese bindende (haptophore) Gruppe ist das Unentbehrliche für die Möglichkeit der Immunisirung gegen jede Substanz. Handelt es sich dabei um Substanzen, welche besondere biologische oder pathologische Functionen ausüben können, also z. B. um Gifte, Fermente, Coaguline, so ist die Gruppe, welche die Trägerin dieser Function z. B. der Giftigkeit ist, verschieden von der bindenden. Nach dieser Anschauung musste demnach ein Agglutinin zwei Gruppen, eine haptophore und eine functionelle, welche letztere die sichtbare Verklumpung besorgt, enthalten. Zweck des Experimentes musste es sein, die Existenz dieser beiden Gruppen nachzuweisen.

In der That ist das Vorhandensein der specifisch bindenden Gruppe im Agglutinin bereits seit längerer Zeit einwandsfrei nachgewiesen. Bordet¹ war der Erste, welcher die Ehrlich-Morgenroth'schen Bindungsversuche zwischen Zelle und specifischem Immunkörper auf die Agglutinine übertrug und als auch für diese geltend bewies; eine That-sache, welche dann weiterhin von zahlreichen Autoren bestätigt wurde. Wenn man agglutinirendes Serum mit den zugehörigen Zellen versetzt und centrifugirt, so beladen sich letztere mit dem Agglutinin und entziehen es der obenstehenden Flüssigkeit. Demnach besteht zwischen dem im Serum enthaltenen Agglutinin und der in der zugehörigen Zelle (Bacterium oder Blutkörperchen) befindlichen agglutinirbaren Substanz (Nicolle²) eine specifische Bindungsavidität. Ueber die Bindungsverhältnisse zwischen Agglutinin und agglutinirbarer Substanz wurden von Eisenberg und Volk³ im Paltauf'schen Institute sehr eingehende quantitative Untersuchungen angestellt, aus denen sich ergibt, dass die agglutinirbare Substanz sehr wechselnde Mengen von Agglutinin an sich zu binden vermag. Je concentrirter ein Serum an Agglutinin ist, desto grössere absolute Agglutininmengen vermag die agglutinirbare Substanz zu binden. Eisenberg und Volk konnten in dieser Beziehung keine obere Grenze finden, so dass sie überhaupt Zweifel hegen, ob die agglutinirbare Substanz vollständig abgesättigt werden kann. Es kann diese Substanz also ein vielfaches Multiplum derjenigen Dosis Agglutinin an sich binden, welche zum Phänomen der Agglutination erforderlich ist. Es ist dies die analoge „Uebersättigung“, wie ich sie bei den Bindungsversuchen zwischen Gehirn und Tetanusgift, sowie Ehrlich und Morgenroth bei Ziegenblutkörperchen und zugehörigem Immunkörper gezeigt haben. Aus allen diesen Untersuchungen geht also hervor, dass sowohl agglutinable Substanz wie Agglutinin specifisch bindende, haptophore Gruppen besitzen müssen.

Wenden wir uns nun der Frage zu, ob bei dem Phänomen der Agglutination neben den haptophoren noch eigene von diesen verschiedene Functionsgruppen, welche das sichtbare Zusammenballen besorgen, in Thätigkeit treten, so liegen in dieser Hinsicht zuerst von Bail⁴ und Joos⁵ Versuche vor, welche diese Frage bejahen. Bail kommt auf Grund seiner Versuche zu dem Schluss, dass das Agglutinin inactivirt werden, d. h. dass seine Functionsgruppe mit Erhaltung der haptophoren zerstört werden

¹ Bordet, *Annales de l'Institut Pasteur*. 1899.

² Nicolle, *Ebenda*. 1898. T. XII.

³ Eisenberg und Volk, *Diese Zeitschrift*. 1902. Bd. XL.

⁴ Bail, *Prager med. Wochenschrift*. 1901.

⁵ Joos, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXXVI.

könne. Joos zeigte in durchaus einwandsfreier Weise mittels der Absorptionmethode, dass bei völligem Kochsalzmangel in Folge Dialysirung agglutinable Substanz und Agglutinin sich binden, ohne dass aber sichtbare Agglutination eintritt. Durch den Salz-mangel war demnach die Functionsgruppe inactivirt, die haptophore dagegen unbeeinflusst geblieben. Durch Zusatz von Salz liess sich Reactivirung erzeugen, und das sichtbare Phänomen tritt sofort ein. Joos nimmt an, dass das Kochsalz in die Verbindung der agglutinablen und agglutinirenden Substanz eintritt, während Friedberger¹, welcher im Uebrigen die Joos'schen Versuche bestätigt, der Ansicht ist, dass es sich bei der Rolle der Salze nicht um einen Eintritt in die Verbindung der agglutinirbaren Substanz und des Agglutinins handle.

Die ausgedehntesten und beweisendsten Versuche über das Vorhandensein von verschiedenen Gruppen, bindenden und functionellen, bei der Agglutination sind indessen in jüngster Zeit von Eisenberg und Volk veröffentlicht worden. Diese Autoren konnten einerseits durch Vorbehandlung von Typhus- und Cholerabakterien mit Hitze und schwachen Säuren quantitativ zeigen, dass die derart behandelten Bakterien noch Agglutinin aus dem Serum an sich zu binden, aber trotz dieser Bindung nicht mehr entsprechend agglutinirt zu werden vermögen. Wir müssen demnach an der agglutinirbaren Substanz der Bakterien eine stabilere Bindungs- und eine labilere fällbare Gruppe unterscheiden, welch' letztere zum Eintritt der sichtbaren Agglutination nöthig ist.

Entsprechend diesen beiden unterscheidbaren Gruppen an der agglutinablen Substanz in den Bakterien konnten Eisenberg und Volk auch an der agglutinirenden Substanz des Serums eine bindende und eine functionelle, haptophore und agglutinophore Gruppe einwandsfrei unterscheiden. Behandelten die Autoren agglutinirendes Serum durch Erwärmen auf 65° oder durch Versetzen mit gleichen Theilen $\frac{1}{4}$ norm. HCl oder verdünnten Alkalien und nachträglicher Neutralisirung, so konnten sie zeigen, dass derartiges Agglutinin von den betreffenden Bakterien noch gebunden wird, ohne dass Agglutination eintritt. Wurden nämlich die Bakterien, welche in einem derart behandelten und inactivirten Serum eine Zeit lang verweilt hatten, nunmehr mit frischem, vollwirksamem, agglutinirendem Serum zusammen gebracht, so wurden sie auch von diesem nicht mehr agglutinirt, indem die haptophore Gruppe der agglutinablen Substanz bereits vorher besetzt worden war.

Ich war kurze Zeit nach Veröffentlichung der soeben aus einander gesetzten Versuche von Eisenberg und Volk über die Constitution der

¹ Friedberger, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1901.

agglutinablen und agglutinirenden Substanz in der Lage, dieselben zu bestätigen¹, da ich damals fast mit den analogen Versuchen wie die genannten Autoren beschäftigt war. Ich stellte die betreffenden Experimente an Typhus- und Pyocyaneusbacillen und den entsprechenden agglutinirenden Seris an und zwar zum Theil in einer mit der Eisenberg-Volk'schen Versuchsanordnung völlig übereinstimmenden, zum Theil in einer von ihr abweichenden Weise. Bei den ersteren Versuchen zerstörte ich wie diese Autoren die Functionsgruppen der agglutinablen Substanz und des Agglutinins durch Einwirkung von $\frac{1}{10}$ Normal-Salzsäure, in einer anderen Versuchsreihe zog ich indessen abweichend von Eisenberg und Volk das Thierexperiment heran, um das Vorhandensein einer von der haptophoren Gruppe unterscheidbaren functionellen Gruppe an der agglutinablen Substanz der Bakterien zu zeigen.

Der Vollständigkeit halber füge ich in beistehender Tabelle I auch die erste der Eisenberg-Volk'schen Versuchsanordnung entsprechende Versuchsreihe bei.

Tabelle I.

Versuch über Vorhandensein von haptophorer und functioneller Gruppe in der agglutinablen Substanz von Typhusbacillen.

Typhusserum von Kaninchen. Agglutinationswerth 1:600².

16. XI. 1901. Drei Agarculturen Typhusbacillen bleiben während drei Stunden mit $\frac{1}{10}$ Normal-Salzsäure bei 37° suspendirt, werden centrifugirt und bis zur neutralen Reaction mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Eine Oese dieser so behandelten Typhusbacillen wird von obigem Serum weder in Verdünnung 1:100 noch 1:10 agglutinirt.

Solche nicht mehr agglutinablen Typhusbacillen werden nunmehr zu obigem Serum von Wirkungswerth 1:600 zugesetzt; nach einigem Verweilen bei 37° abcentrifugirt und das Centrifugat auf seine verbleibende agglutinirende Wirkung mit normalen Typhusbacillen geprüft.

Menge der zugesetzten, mit $\frac{1}{10}$ HCl vorbehandelten Typhusbacillen.	Verdünnung des agglutinirenden Serums.	Agglutinationsvermögen des Centrifugates berechnet auf das unverdünnte Serum.
1 Agarcultur.	10 ^{cem} 1:10.	1:50 unvollständige Agglutination, 1:100 keine Agglutination.

¹ A. Wassermann, Discussion zu Ehrlich's Vortrag: „Die Seitenkettentheorie und ihre Gegner“. *Deutsche med. Wochenschrift*. 1902. Ver.-Beil. Nr. 3.

² Als Grenzwert der agglutinirenden Serums bezeichne ich stets diejenige kleinste Dose Serum, welche eine Oese 24stündiger Cultur in 1^{cem} der Verdünnung mit 0.85 Procent NaCl im Reagensglase aufgeschwemmt, völlig agglutinirt, so dass die obenstehende Flüssigkeit ganz klar ist.

Wir ersehen aus dem vorstehenden Versuche, dass Typhusbacillen, welche in Folge Säureeinwirkung inagglutinabel geworden sind, trotzdem noch beträchtliche Mengen Agglutinin zu binden vermögen, so dass durch deren Zusatz und Abcentrifugieren die Wirksamkeit des agglutinirenden Serums von 1:600 auf knapp 1:50 herabgesetzt wird. Demnach besteht eine resistenterere haptophore und eine labilere functionelle Gruppe in der agglutinablen Substanz, welch' letztere wir als agglutinable Gruppe bezeichnen wollen.

Wir haben nun, wie schon erwähnt, die Existenz dieser beiden Gruppen noch auf andere Weise, mit Hülfe des lebenden Organismus nachgewiesen. Nach der Seitenkettentheorie ist das Wesentliche für die Production specifischer Gegenstoffe im Serum das Vorhandensein der specifisch bindenden Gruppen an dem zur Immunisirung verwendeten Ausgangskörper, so dass er an die passenden Receptoren gebunden werden kann. So vermag man mit den ihrer Functionsgruppe der toxophoren Gruppe beraubten Toxinen, den Toxoiden, welche nur mehr ihre haptophore Gruppe besitzen, vollwirksame Antitoxine zu erzeugen (Ehrlich), ebenso mit den Complementoiden (P. Müller, Ehrlich und Morgenroth) im lebenden Organismus Anticomplemente zu erzielen. Dementsprechend musste es gelingen, auch mit Bakterien, welche durch Vorbehandlung mit $\frac{1}{10}$ HCl inagglutinabel geworden waren, mittels Vorbehandlung von Thieren ein agglutinirendes Serum zu erhalten, falls die Inagglutinabilität auf Zerstörung nur der agglutinablen bei Erhaltung der haptophoren Gruppe beruhte. Denn in diesem Falle konnte die betreffende Substanz der Bakterien im thierischen Organismus noch an die Receptoren gebunden werden. In der That gelingt dieses Experiment sehr leicht.

Tabelle II.

Erzielung von agglutinirendem Serum mittels inagglutinablen Bakterien.

Kaninchen I.	Kaninchen II.
1. XII. 1901. Eine durch Behandeln mit $\frac{1}{10}$ HCl inagglutinabel gewordene Typhus-Agarcultur intravenös.	1. XII. 1901. In der gleichen Weise wie nebenstehendes Kan. I vorbehandelt.
Blutserum vor der Injection agglutiniert Typhusbacillen 1:10 nicht vollständig, 1:20 negativ.	20. XII. entblutet.
6. XII. Eine ebenso behandelte Typhuscultur intravenös.	Serum 1:100 agglutiniert Typhusbacillen vollständig.
16. XII. Thier entblutet.	1:200 nach einiger Zeit nicht vollständig.
Serum agglutiniert Typhusbacillen 1:200 vollständig.	

Nachdem durch die vorstehenden Versuche das Vorhandensein einer haptophoren und einer agglutinablen Gruppe an der agglutinirbaren Substanz der Bakterien nachgewiesen war, wurde in analoger Weise das Bestehen zweier Gruppen an der agglutinirenden Substanz des Serums experimentell gezeigt. Zu diesem Behufe habe ich in analoger Weise, wie dies bereits von Eisenberg und Volk publicirt wurde, agglutinirendes Serum mit gleichen Theilen $\frac{1}{5}$ norm. HCl versetzt, nach mehreren Stunden Verweilens bei 37° neutralisirt und dann dieses so behandelte Serum auf seine agglutinirende Kraft geprüft. Typhusserum vom ursprünglichen Werthe 1:600 rief alsdann bei Verdünnung 1:10 keine Agglutination mehr hervor. Um nun zu beweisen, dass trotz des Fehlens der Agglutination die mit diesem inactivirten Serum in Berührung gewesenen Typhusbacillen dennoch sich mit inactivem Agglutinin beladen hatten, die haptophore Gruppe des Agglutinins also noch vorhanden war, wurden diese Typhusbacillen von Neuem mit intactem Serum versetzt. Hatten die Typhusbacillen sich thatsächlich beladen, dann durfte auch der neue Zusatz von unverändertem Serum keine Agglutination hervorrufen, da ja die haptophore Gruppe der agglutinirbaren Substanz alsdann bereits verstopft war, vorausgesetzt, dass unverändertes und inactivirtes Agglutinin gleiche Avidität besitzen. Dies ist in der That der Fall.

Tabelle III.

Versuch über Vorhandensein von haptophorer und functioneller Gruppe in der agglutinirenden Substanz von Typhusserum.

18. XI. 1901. 3^{cem} Typhusserum von Kaninchen (Werth 1:600) mit 3^{cem} $\frac{1}{4}$ norm. HCl versetzt, 4 Stunden bei 37° belassen, alsdann neutralisirt. Derart behandeltes Serum 1:10 ergiebt keine Agglutination für Typhusbacillen.

In 1^{cem} (Verdünnung 1:10) des durch HCl inactivirten und neutralisirten Serums wird eine Oese Typhuscultur aufgeschwemmt. Nach einiger Zeit, nachdem keine Agglutination eingetreten ist, wird 1^{cem} vollwirksamen Serums (Verdünnung 1:200) zugefügt; es tritt auch hierbei keine Agglutination ein, während in der Controle die Verdünnung 1:200 eine Oese der gleichen Typhuscultur sofort vollständig agglutinirt.

Aus dem vorstehenden Versuche ersehen wir also, dass die haptophore Gruppe der agglutinirbaren Substanz verstopft war, so dass neues Agglutinin nicht mehr aufgenommen werden konnte. Es besitzt also auch die agglutinirende Substanz zwei Gruppen, eine stabilere haptophore und eine labilere Functionsgruppe, die agglutinophore. Nach dem Beispiele der Toxoide, Complementoide u. s. w. können wir für die Agglutinine, welche die agglutinophore Gruppe verloren haben,

den bereits von Eisenberg und Volk vorgeschlagenen Namen Agglutinoide wählen. Um die Wirkung von Agglutinoiden handelt es sich offenbar auch bei dem von Bail angegebenen Versuche, wonach Bakterien, welche der Wirkung eines bei 75° inactivirten agglutinirenden Serums ausgesetzt worden waren, inagglutinabel werden.

Mittels der zweiten, oben erwähnten, zum Nachweise der haptophoren Gruppe der agglutinirbaren Substanz von mir gewählten Versuchsanordnung durch das lebende Thier, konnte bei der agglutinirenden Substanz das Vorhandensein der beiden Gruppen nicht geführt werden. Entsprechend dem obigen Versuche in Tabelle II musste es hier gelingen durch Vorbehandlung von Thieren mit Agglutinoiden im Serum ein Antiagglutinin, welches die Wirkung des Agglutinins aufhebt, zu erzielen. Indessen waren alle meine Bemühungen, worauf ich noch weiter unten zu sprechen kommen werde, ein Antiagglutinin gegenüber einem Bakterienagglutinin zu erhalten, im Einklang mit der Seitenkettentheorie ebenso vergeblich, wie das anderer Autoren (Kraus). Das Bakterienagglutinin besitzt seine Rezeptoren in der zugehörigen Bakterienzelle und ein Erfolg ist also nur zu erzielen, wenn wir eine Thierart treffen, welche zufällig ganz ähnliche zu dem Agglutinin einpassende Rezeptoren besitzt. Dieses ist mir indessen trotz Versuches an allen möglichen Thierarten bisher nicht gelungen, wohl aber gelingt dies leicht für Hämagglutinine. Denn hier besitzt das Agglutinin seine Rezeptoren im rothen Blutkörperchen, also einem Bestandtheile des lebenden Organismus und dementsprechend ist hier die Möglichkeit der Bildung von Antiagglutinin gegeben.

Aus diesen Gründen können wir als Beweis für das Vorhandensein zweier Gruppen an der agglutinirenden Substanz nur die soeben aus einander gesetzten Versuche im Reagenzglase anführen, nicht aber Versuche im lebenden Organismus. Wir ersehen somit, dass bei dem Phänomen der Agglutination vier verschiedene Gruppen gegenseitig in Thätigkeit treten, die beiden haptophoren Gruppen an der agglutinablen bzw. agglutinirenden Substanz, sowie die agglutinable und die agglutinophore Gruppe.

Die gleichen Versuche, wie sie in den Tabellen als mit Typhusbacillen und Typhusserum ausgeführt geschildert wurden, habe ich auch mit *Bacillus pyocyaneus* und *Pyocyaneus*-Immunserum angestellt. Indessen will ich der Kürze halber, da die Resultate die gleichen waren, diese hier nicht ausführlich wiedergeben.

Was die praktische Bedeutung der soeben besprochenen Constitution der agglutinirbaren und agglutinirenden Substanz angeht, so müssen wir uns vor allem gegenwärtig halten, dass die Functionsgruppe in beiden die weit labilere gegenüber der haptophoren ist. Es kann also durch spontane Schädlichkeiten, z. B. des Nährbodens, durch Zusätze, die demselben gemacht

wurden, zu starke Alkalescentz desselben, unter Umständen die labile agglutinable Gruppe in Bakterien functionsunfähig werden, ebenso wie ein ungeeigneter Nährboden, z. B. die labilere Functionsgruppe von Giften, Diphtherie- oder Tetanusgift nicht zur vollen Ausbildung kommen lässt. Derartige Bakterien sind dann nicht oder unvollständig agglutinabel, binden aber noch Agglutinin. Es entsteht demnach unter diesen Umständen die praktisch wichtige Frage, ob wir berechtigt sind, bei Bakterien, z. B. fraglichen Typhusbacillen, sofern sie alle übrigen Kennzeichen der echten Vertreter dieser Species bieten, einfach auf den negativen Ausfall der Agglutination hin die Diagnose zu stellen, dass es sich nicht um die betreffende Bakterienart handelt. Unter allen Umständen ist die Feststellung der specifisch bindenden Eigenschaften einer derartigen fraglichen Bakterien-species für das betreffende Agglutinin ein sichererer Weg, da die haptophore Gruppe weit stabiler ist. Wir werden auf diesen Punkt noch weiter unten ausführlicher zu sprechen kommen. Andererseits kann nun auch der spontane Fortfall der labileren Functionsgruppe des Agglutinins im Serum, also die spontane Bildung von Agglutinoiden praktisch in Frage kommen. Dass thatsächlich ältere Sera spontan eine derartige Umwandlung ihrer Agglutinine erleiden können, zeigten bereits Eisenberg und Volk an dem Beispiele eines über ein Jahr alten Typhusserums. Diese Autoren zeigten auch bereits die praktischen Folgen, die eine solche Umsetzung hat. Da, wie wir sahen, Bakterien Agglutinoide noch binden, dann aber in Folge der Verstopfung ihrer haptophoren Gruppe durch die Agglutinoide nun von intactem Agglutinin nicht mehr agglutiniert werden, so können Agglutinoide, welche sich in einem Serum gebildet haben, agglutinationshemmend wirken. Ist in einem Serum, das sich partiell zersetzt hat, ein Theil Agglutinoide, ein anderer noch Agglutinine, so sind drei Möglichkeiten vorhanden. Entweder die Agglutinoide haben grössere Avidität zur Bakterienzelle wie die unveränderten Agglutinine, oder sie haben die gleiche Avidität oder endlich eine geringere. Der letztere Fall wird praktisch keine weiteren Folgen haben, als dass ein solches Serum als im Ganzen abgeschwächt erscheint, indem Verdünnungen, welche früher noch agglutinierten, nunmehr unwirksam sind. Der erste Fall, welchen Eisenberg und Volk bei einem lange conservirten Typhusserum beobachteten, führt zu einem sehr paradox erscheinenden Verhalten des Serums. Da in diesem Falle die Bakterien vermöge der grösseren Avidität sich zuerst mit den unwirksamen Agglutinoiden sättigen, so wird also so lange keine sichtbare oder vollständige Agglutination eintreten, als noch Agglutinoide neben unverändertem Agglutinin vorhanden sind. Dadurch ergibt sich also das paradoxe Verhalten eines solchen Serums, dass die niederen Verdünnungen, welche noch Agglutinoide

enthalten, nicht agglutinieren, während erst stärkere Verdünnungen, welche keine oder nur mehr geringe Mengen dieser Stoffe beherbergen, umgekehrt prompte Agglutination ergeben. Dieses Phänomen wurde, wie gesagt, von den genannten Autoren beobachtet, und sie kommen daher für diesen Fall mit Recht zum Schluss, dass die Agglutinoide eine höhere Avidität wie die Agglutinine zur Bakterienzelle besitzen müssen.

Nach meinen eigenen Erfahrungen über diesen Punkt, die sich auf altes Choleraserum beziehen, muss ich für dieses den zweiten Fall, also die gleiche Avidität der beiden Substanzen annehmen.

In diesem Falle muss sich ein sehr unregelmässiges Verhalten des Serums ergeben. Je nachdem zufälliger Weise mehr oder weniger Bakterien Agglutinin oder Agglutinoide binden, wird die Agglutination eine mehr oder weniger unvollständige sein. Eine vollständige Agglutination kommt überhaupt nicht zu Stande, selbst bei den schwächsten Verdünnungen nicht, indem stets ein Theil der Bakterien sich mit Agglutinoiden verbindet. Dadurch kommt das Verhalten zu Stande, dass z. B. eine Verdünnung 1:200 Choleravibrionen unvollständig agglutiniert, die Verdünnung 1:10 indessen ebenfalls keine völlige Agglutination ergibt. Das Charakteristische eines solchen Serums mit Synagglutinoiden liegt also in der innerhalb einer weiten Zone verbreiteten unvollständigen Agglutination. Ja, es kann selbst vorkommen, wie aus der folgenden Tab. IV zu ersehen ist, dass in einer Versuchsreihe eine Verdünnung kaum Agglutination ergibt, indem sich zufällig die Mehrzahl der Bakterien mit Agglutinoiden verband, während dieselbe Verdünnung in einem anderen Versuche eine weit stärkere Agglutination ergibt, da diesmal mehr unveränderte Agglutinine gebunden wurden.

Das Verhalten eines derartigen Serums zeigt Tabelle IV. Das Serum ist ein aus dem Jahre 1896 stammendes, von Ziegen gewonnenes Cholera-Immunserum, das mit 0.5 Procent Carbol conservirt ist.

Tabelle IV.

Datum	Verdünnung des Serums	Agglutination
27. I. 1902	1:10	unvollständige Agglut.
	1:50	"
	1:100	"
	1:200	"
	1:400	"
30. I. 1902	1:10	"
	1:50	keine Agglutination
	1:100	unvollständige Agglut.
	1:200	"
	1:400	keine Agglutination

Dass es sich bei diesem alten Choleraserum thatsächlich um die Bildung von Agglutinoiden handelte, konnte leicht bewiesen werden, indem die von ihm nicht oder unvollständig agglutinierten Cholera vibrien auch bei nachherigem Zusatz vollwirksamen frischen Choleraserums nicht mehr zur Agglutination kamen. Uebrigens wandelt sich nach meinen Erfahrungen auch in frischen Seris recht häufig ein Theil der Agglutinine rasch in Agglutinoide um. Besonders bei sehr hochwerthigen Seris findet man in den ersten Tagen nach Entnahme des Serums eine beträchtliche Abnahme, worauf sich der Titer für längere Zeit constant hält.

Ob eventuell auch im lebenden Organismus, bei Thieren, die früher ein sehr hoch agglutinirendes Serum hatten, und deren Agglutinationswerth dann trotz fortdauernder Immunisirung stark herabgeht, wie man bisweilen beobachtet, es spontan zu einer Agglutinoïdbildung kommen kann, konnte ich mangels geeigneten Materiales bisher nicht entscheiden.

II. Die Stellung der Agglutinine in Bezug auf andere im Serum vorhandene Stoffe.

Ueber das Verhältniss, in welchem die Agglutinine zu den anderen bei der Immunisirung im Serum auftretenden Stoffen, zu den Immunkörpern, Präcipitinen u. s. w., stehen, gehen die Meinungen der Autoren noch weit aus einander.

Ich habe mich in dieser Hinsicht zunächst der Frage zugewendet, ob die im normalen Serum vorhandenen und die bei der Vorbehandlung von Thieren im Immunserum auftretenden agglutinirenden Substanzen identische oder verschiedene Körper seien. Früher, in den ersten Jahren nach Entdeckung der Agglutinine, waren die Meinungen in letzterem Sinne einig. Man nahm an, dass es sich bei den im normalen Serum vorkommenden Agglutininen um nichtspecifische Stoffe handle, die gleichzeitig alle möglichen Bakterien zu verklumpen vermögen, während im Gegensatze hierzu im Immunserum ein anderes specifisches nur auf eine einzige Bakterienart abgestimmtes Agglutinin auftrete. Diese Ansicht musste aufgegeben werden, als Bordet für die im normalen Serum vorkommenden Bakterienagglutinine und Malkoff für die normalen Häm-agglutinine mittels der Ehrlich'schen electiven Absorptionsmethode der Nachweis gelang, dass es sich bei dieser scheinbaren Nichtspecificität um das gleichzeitige Vorkommen mehrerer specifischer Agglutinine im normalen Serum handelt. Immerhin aber gaben diese Versuche darüber keine Auskunft, ob es sich dabei um identische oder verschiedene Substanzen handelt. Ich versuchte diese Frage für Bakterienagglutinine in folgender Weise zu lösen. Wenn es gelingt, einerseits gegen ein im normalen

Serum vorhandenes Agglutinin und andererseits gegen das entsprechende auf die gleiche Bakterienart wirkende, im Immunserum auftretende Agglutinin durch Vorbehandlung von Thieren mit derartigen Seris Antiagglutinine zu erhalten, und es hebt ein solches Antiagglutinin vice versa die Wirkung des normalen und des immunisatorisch gewonnenen Agglutinins auf, so war damit die Identität dieser Substanzen bewiesen. Nach dem bereits oben Erwähnten war es zum Gelingen dieses Versuches nothwendig, eine Thierart zu finden, welche zufälliger Weise einpassende, abstossungsfähige Receptoren zu einem Bakterienagglutinin besitzen musste. Ich wählte zu diesen Versuchen normales und immunisatorisch gewonnenes Agglutinin für den *Bacillus pyocyaneus*. Das normale Agglutinin für diesen Bacillus ist im frischen Ziegen Serum enthalten, indem eine Verdünnung 1:10 normalen Ziegen Serums *Pyocyaneus* bacillen in kurzer Zeit vollständig agglutiniert. Das immunisatorische gewann ich von einer mit *Pyocyaneus* bacillen vorbehandelten Ziege. Es wurden nunmehr eine Reihe der verschiedenartigsten Thiere, Kaninchen, Hühner, Meerschweinchen, einerseits mit dem Serum der normalen, andererseits mit demjenigen der immunisirten Ziege vorbehandelt und das Serum alsdann auf seine die Wirkung des im normalen und im Immunserum vorhandenen *Pyocyaneus*-Agglutinins aufhebende antiagglutinirende Kraft geprüft. Indessen bei keiner der genannten Thierarten war es gelungen, ein deutlich in die Erscheinung tretendes Antiagglutinin weder gegenüber dem normalen noch dem immunisatorischen Agglutinin zu erhalten.¹ Das Serum der mit Ziegen Serum vorbehandelten Thiere ergab beim Mischen mit Ziegen Serum Präcipitine, aber nach Absetzenlassen dieser Eiweissniederschläge zeigten sich sowohl die normalen wie die immunisatorischen Agglutinine in der obenstehenden Flüssigkeitsschicht quantitativ erhalten. Es war demnach nicht gelungen, ein Bakterienantiagglutinin zu erzielen.

Infolgedessen veranlasste ich Hrn. Dr. Ford, diese Frage bei den Hämagglutininen experimentell zu untersuchen. Bei diesen liegen, wie schon oben erwähnt, die Verhältnisse nach der Seitenkettentheorie zur Lösung dieser Frage weit günstiger.

Nehmen wir als Beispiel ein normales und ein immunisatorisch gewonnenes Agglutinin für die rothen Blutkörperchen des Huhnes, so haben beide ihre Receptoren in den Erythrocyten dieses Thieres, also in normalen Bestandtheilen eines lebenden Thieres. Hier war also durch Vorbehandlung des betreffenden Thieres, des Huhnes, einerseits mittels nor-

¹ Ich bin daher auch der Meinung, dass bei der Aufhebung der angeborenen Resistenz durch Anticomplemente (siehe Wassermann, *diese Zeitschrift*, 1901) Antiagglutinine nicht die Rolle spielen, welche Bedstreet (Annales de l'Institut Pasteur, 1901) ihnen zuzuschreiben scheint.

malen, andererseits Immunagglutinins die Möglichkeit zur Abstossung dieser Receptoren und damit zur Production von Antiagglutininen weit wahrscheinlicher als bei den Bakterienagglutininen, welche ihre Receptoren in der Bakterienzelle, keinem Bestandtheile des normalen Organismus besitzen. In der That ist es Ford¹, welcher diese Untersuchungen im Institut für Infectiouskrankheiten ausführte und über dieselben bereits berichtet hat, gelungen, auf diese Weise sowohl ein Antiagglutinin gegenüber einem im normalen Serum befindlichen Hämagglutinin als auch dem entsprechenden immunisatorisch gewonnenen Hämagglutinin darzustellen. Bei der gegenseitigen Einwirkung dieser Antiagglutinine auf Agglutinine zeigte es sich, dass einerseits das mittels Vorbehandlung von normalem Serum gewonnene „normale Antiagglutinin“ die Wirkung des Immun-Agglutinins und umgekehrt das „Immun-Antiagglutinin“ diejenige des im normalen Serum enthaltenen Agglutinins aufzuheben vermag. Damit ist die Identität dieser Stoffe erwiesen, und wir dürfen bei der vollkommenen Analogie zwischen Hämagglutininen und Bakterienagglutininen den gleichen Schluss auch für diese ziehen.

Die Immunagglutinine sind also nur in Folge des Immunisirungsvorganges vermehrt abgestossene Gruppen, welche unter Umständen in geringer Anzahl bereits im normalen Serum abgestossen kreisen.

Eine weitere Frage aus diesem Capitel, deren Beantwortung noch durchaus nicht in einheitlichem Sinne erfolgt, ist die gegenseitige Stellung von Agglutininen und Präcipitinen, also jener Stoffe im agglutinirenden Immunserum, welche nach der Entdeckung von Kraus gelöste Bakterienproducte in Culturfiltraten zum Ausfällen bringen. Auch hier gehen die Meinungen weit darüber aus einander, ob diese beiden Stoffe identisch oder verschieden seien. Der Entdecker der Präcipitine Kraus und dessen Lehrer Paltauf waren Anfangs der Meinung, dass die Präcipitine in engstem Zusammenhange mit dem Phänomen der Agglutination stehen, indem die Bakterien bei der Bildung des Niederschlages mechanisch mit niedergerissen werden und dadurch das Phänomen der Agglutination zu Stande kommt. Demgegenüber nehmen zahlreiche andere Autoren an, dass die Niederschlagsbildung in Culturfiltraten und die Agglutination in Bakterienaufschwemmungen durch das Immunserum verschiedene Vorgänge und dementsprechend die präcipitablen und agglutinablen Substanzen in Bakterien, sowie die präcipitirende und agglutinirende Substanz im Serum ebenso verschieden sind. Radziewsky² suchte diese

¹ Ford, *Diese Zeitschrift*. 1902.

² Radziewsky, *Ebenda*. Bd. XXXIV.

Frage experimentell in der Art zu entscheiden, dass er Culturfiltrate von *Bacterium coli* mit austitrimtem agglutinirenden Serum versetzte und nach eingetretener Präcipitinbildung und Absetzenlassen des Niederschlages den zurückgebliebenen agglutinirenden Titre der obenstehenden Flüssigkeit quantitativ bestimmte. Er fand, dass trotz eingetretener reichlicher Präcipitinbildung der Agglutinationswerth fast quantitativ erhalten geblieben war und kommt daher zu dem Schlusse, dass Präcipitinbildung und Agglutination nicht identisch sind.

Zu dem gleichen Schlusse kommen Bail¹ und Pick², Letzterer auf Grund chemischer Differenzen der beiden Stoffe.

Demgegenüber legen Kraus und v. Pirko³ besonderen Werth auf die quantitativen Verhältnisse, in welchen präcipitirbare Substanz und präcipitirendes Serum zu einander stehen. Bei einem bestimmten relativen Verhältniss zwischen Culturfiltrat und präcipitirendem Serum trat in ihren Versuchen nach eingetretener Präcipitirung ein deutlicher Verlust auch an Agglutinationswerth für Bakterien in dem Serum auf, welches die Präcipitirung hervorgerufen hatte. Kraus und v. Pirko kommen daher zu dem Schlusse, dass in der präcipitirbaren Substanz von Culturfiltraten ein Antheil vorhanden ist, der mit der agglutinirbaren Substanz in den Bakterien biologisch identisch ist.

Als ich selbst derartige Versuche zur Klärung dieser Frage anstellte, war ich ebenfalls nach den erhaltenen ersten Resultaten der Ansicht von Radziewsky, Bail, Pick u. A., dass präcipitable Substanz in Culturfiltraten und agglutinirbare Substanz in Bakterien verschieden seien, indem sich bei Anwendung von ca. gleichen Theilen Filtrates und Serums nach Abdekantirung des gebildeten Niederschlages die agglutinirende Kraft der Flüssigkeit quantitativ erhalten zeigte.

Hr. Geheimrath Koch, dem ich seiner Zeit diese Versuche vorführte, war indessen trotzdem fortgesetzt der Ansicht, dass agglutinirbare und präcipitirbare Substanz identisch seien, und veranlasste mich deshalb, diese Versuche weiter fortzusetzen.

Ich ging in Folge dessen in der Art vor, dass ich zu gleichbleibenden Mengen agglutinirenden und präcipitirenden Serums verschiedene Volumina Culturfiltrates zusetzte, und in der That ergab sich nunmehr bei einer genügend grossen Dosis von zugesetztem Filtrate, dass nach eingetretener Präcipitation die obenstehende Flüssigkeit auch sehr starken Verlust an ihrem agglutinirenden

¹ Bail, *Archiv für Hygiene*. 1902.

² Pick, *Beiträge zur phys. Chemie*. 1901.

³ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXXII. Nr. 1.

Titer erlitten hatte. Wir müssen demgemäss annehmen, dass in der präcipitirbaren Substanz in Culturfiltraten die gleiche Substanz enthalten ist, welche bei der Agglutination von Bakterien in Thätigkeit tritt. Die gleiche Substanz, welche bei der Agglutination innerhalb der noch erhaltenen Bakterienzelle sich mit dem agglutinirenden Serum bindet, ist in den Culturfiltraten aus den Bakterien ausgelaugt in der Flüssigkeit frei vorhanden und giebt dort mit dem Serum einen specifischen Niederschlag.

Die beistehende Tabelle V möge die soeben angeführten Versuchsergebnisse wiedergeben.

Tabelle V.

Versuch über die Identität von Präcipitin und Agglutinin.
Agglutinations-Grenzwert des verwendeten agglutinirenden Pyocyaneus-
Immunserums von Kaninchen 1:1200.

Versuch A.

12. IV. 1902. 2^{cem} obigen Serums werden mit 2^{cem} sterilen Pyocyaneus-Culturfiltrates versetzt, sofortige Niederschlagsbildung. Nach 24 stündigem Stehen wird von dem voluminösen Niederschlage decantirt, ein Theil der klaren Flüssigkeit mit neuem Filtrat versetzt, es tritt nach mehreren Stunden noch eine Spur von Trübung auf. Der andere Theil der decantirten Flüssigkeit wird auf seinen agglutinirenden Titer geprüft. 1:1000 ergiebt nach einigen Minuten deutliche Agglutination der Pyocyaneusbacillen. Agglutinirender Titer also trotz fast vollständigen Verlustes der präcipitirenden Kraft quantitativ erhalten.

Versuch B.

12. IV. 1902. 2^{cem} des gleichen Serums mit 18^{cem} Pyocyaneus-Culturfiltrates versetzt, 24 Stunden stehen gelassen, alsdann von der gebildeten Präcipitatsäule abdecantirt. Neuzusatz von Culturfiltrat ergiebt keine Spur mehr von Niederschlagsbildung. Prüfung des agglutinirenden Titors der abdecantirten Flüssigkeit auf das ursprüngliche Serum berechnet:

1:1000	nach 5 Minuten	keine Spur	Agglutination,
1:700	"	"	"
1:100	"	"	unvollständige Agglutination.

Aus der vorstehenden Versuchs-Tabelle ersehen wir demnach, dass bei nicht ganz vollständiger Erschöpfung des Serums an präcipitirender Kraft (Versuch A) der agglutinirende Titer vollkommen erhalten bleibt, indem offenbar zum Phänomen der Agglutination weit geringere Mengen der gleichen Substanz im Serum ausreichen als zu dem der deutlichen Präcipitation. Um einen beträchtlichen Verlust an agglutinirender Kraft des Serums nach Präcipitinbildung zu erzielen, muss ein grosser Ueberschuss

an Culturfiltrat zugesetzt werden (Versuch B), da erst dann eine quantitativ genügende Bindung der specifischen Substanz des Serums erfolgt. Es sprechen also diese Versuche vollkommen für die Ansicht von Kraus und v. Pirko von der Identität der beiden Substanzen. Ich glaube indessen nicht, dass der gesammte Niederschlag, der in alten Culturfiltraten bei Zusatz von Immunserum sich bildet, ausschliesslich nur aus der Substanz besteht, welche bei der Agglutination innerhalb der Bakterienzelle präcipitirt wird. Diese letztere Substanz bildet einen Bestandtheil des Präcipitates, daneben können indessen in alten Culturfiltraten sicher noch andere aus den ausgelaugten Bakterienkörpern herrührende Substanzen vorhanden sein, ich erinnere nur an die Leukocyten und Erythrocyten lösenden Stoffe, welche beim Immunisiren ebenfalls Receptoren im Organismus finden und demgemäss dann von dem Serum gleichfalls präcipitirt werden. Auf diese Weise deute ich die auf Grund äusserst sorgfältiger chemischer Untersuchungen von Pick gefundene Thatsache eines vom Agglutinin verschiedenen Coagulins.

Der directe Weg, die Stellung der agglutinablen und präcipitablen Substanz zu einander zu bestimmen durch Immunisiren von Thieren mit möglichst reinen chemischen Substanzen und Vergleich des erhaltenen Serums auf seine agglutinirende bzw. präcipitirende Wirkung ist bisher, soweit ich die Litteratur übersehe, nicht gelungen.

Eine weitere praktisch und theoretisch gleich wichtige Frage ist das Verhalten von Agglutinin zu Immunkörpern (Amboceptor).

In dieser Hinsicht betont Baumgarten¹ die Identität dieser Substanzen, und auch Gruber² nimmt einen innigen Zusammenhang zwischen dem Phänomen der Agglutination und der Auflösung von Bakterien an. Demgegenüber stehen die Ansichten der grossen Mehrzahl anderer Forscher, wie Ehrlich und Morgenroth, Mertens, Bordet, Metschnikoff, Gengou, Castellani u. A., welche Agglutinine und Immunkörper (Amboceptoren) als völlig verschiedene und unabhängig neben einander auftretende Körper betrachten. In jüngster Zeit ist es endlich Brieger³ gelungen, aus Typhusbacillen eine Substanz zu gewinnen, mittels deren Schütze⁴ bei Thieren ein stark agglutinirendes Serum, indessen keine Erhöhung der baktericiden Kraft erhielt, so dass dies ebenfalls für die Verschiedenheit der beiden Substanzen spricht.

¹ Baumgarten, *Berliner klin. Wochenschrift*. 1901.

² Gruber, *Münchener med. Wochenschrift*. 1901.

³ Brieger, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1902.

⁴ Schütze, *Ebenda*. 1902.

Die Lösung dieser, wie gesagt, noch immer strittigen Frage ist allerdings nicht so leicht, wie es auf den ersten Anblick erscheint. Das Einfachste und Beweisendste wäre, einen Antiimmunkörper oder ein Antiagglutinin zu erzielen und zu prüfen, ob jedes dieser Sera die Wirkung von Immunkörper und Agglutinin in gleichen Mengenverhältnissen aufhebt oder nicht. Indessen ist, wie schon oben erwähnt, die Herstellung eines Bakterien-Antiagglutinins bisher nicht gelungen. Die meisten Autoren gründen nun ihre Ansicht von der Verschiedenheit von Agglutinin und Immunkörper darauf, dass es leicht gelingt, Sera zu finden, welche stark agglutinieren ohne Bakterien zu lösen, oder dass bei längerer quantitativer Beobachtung eines Serums agglutinirende und baktericide Kraft nicht parallel gehen. Alle diese Fälle kommen in der That, wie Jeder, der sich mit diesen Dingen praktisch beschäftigt, weiss, sehr häufig vor. Am leichtesten ist dies bei Hog-Cholera zu demonstrieren, wo es unschwer ge-

lingt, ein Serum von ungemein starkem Agglutinationswerth ohne jede Immunisirungskraft zu gewinnen. Indessen beweist dies für die vollkommene Verschiedenheit von Agglutinin und Immunkörper nichts. Der Immunkörper bedarf zu seiner Wirkung stets des Complementes, das Agglutinin nicht, wie am beweisendsten aus meinen Anticomplement-Versuchen hervorgeht. Das Anticomplement hebt die Wirkung des Immunkörpers, nicht aber die der agglutinirenden Substanz auf. In Folge dessen ist eine quantitative Differenz zwischen agglutinirender und bakterien-auflösender Kraft eines Serums noch kein Beweis gegen die Identität von Agglutinin und Immunkörper, indem letzterer wohl vorhanden, aber nicht das zur Entfaltung seiner Wirkung nöthige Complement vorfindet. Es können demnach trotzdem die beiden Substanzen ein und dieselbe haptophore Gruppe besitzen, wie es beistehende Zeichnung wiedergiebt. Aus dieser geht klar hervor, dass bei nicht genügend vorhandenem Complement die Lösung ausbleiben muss, während die Agglutination eintritt, trotzdem

in diesem hier aufgezeichneten Falle Agglutinin und Immunkörper ein und denselben Amboceptor bzw. haptophore Gruppe besitzen. Quantitative Schwankungen zwischen den beiden Phänomen beweisen also nichts gegen die Identität des Amboceptors für beide. Auch die von Mertens¹ herangezogene Thatsache, dass ein sehr altes, Jahre lang aufgehobenes Choleraserum seine agglutinirende, nicht aber seine bakterienauflösende Eigenschaft einbüsst, ist nach den weiter oben aus einander gesetzten Verhältnissen über die Constitution der Agglutinine nicht beweisend für die völlige Verschiedenheit von Immunkörper und Agglutinin. Denn wir wissen, dass die agglutinophore Gruppe sehr labil ist und in alten Seris zum grössten Theil zerstört wird, so dass dann nur die resistenter haptophore Gruppe zurückbleibt, das Agglutinoid. Dies letztere ist indessen bisher nicht reactivirbar, wie dies für den Immunkörper wohl der Fall ist, so dass ein solches Serum dann keine sichtbare Agglutination mehr giebt, wohl aber im Thierkörper, woselbst der Immunkörper durch das Complement seine lösende Fähigkeit wiederfindet, die ausgesprochenste und gegen den früheren Titer kaum verminderte Lösungskraft für Cholera-vibrionen zeigt. Dass dem in der That so ist, kann man jeder Zeit durch den oben beschriebenen Nachweis von Agglutinoiden in einem solchen Serum führen. Cholera-vibrionen, welche man in ein derartiges altes, nicht mehr agglutinirendes Choleraserum bringt, werden in Folge Beladung mit den Agglutinoiden alsdann inagglutinabel. Es ist also in einem solchen alten, nicht mehr agglutinirenden Serum durchaus nicht das gesammte Agglutinin zerstört, sondern nur die agglutinophore Gruppe, der Amboceptor ist noch vorhanden und dieser kann mit dem Immunkörper identisch sein, nur kann das Agglutinationsphänomen nicht reactivirt werden, wohl aber durch neues Complement die Bakterienauflösung. Die hier in Rede stehende Frage ist indessen nicht bloss eine akademisch theoretische, sondern sie besitzt für den Bakteriologen eine sehr wichtige praktische Seite. Bei der immer mehr zunehmenden Erfahrung, dass es für sehr viele der wichtigsten Infectionserreger, Cholera, Typhus, Dysenterie u. s. w. morphologisch und culturell so nahestehende Arten giebt, dass wir sie mit den gewöhnlichen Differenzierungsmitteln nicht unterscheiden können, sind die Specificitätsreactionen des Immunserrums ein durchaus nöthiges Rüstzeug der bakteriologischen Diagnose geworden. In dieser Beziehung verfügen wir über die specifisch auflösende Kraft des Serums, die wir im Pfeiffer'schen Versuch diagnostisch verwerthen und über die specifisch agglutinirende Eigenschaft eines Immunserrums. Besitzen nun Immunkörper und Agglutinin ein und dieselbe haptophore

¹ Mertens, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1901.

phore Gruppe, dann kann von einer Verschiedenheit in der specifischen Zuverlässigkeit der Phänomene nicht die Rede sein, dann bedeuten beide einfach dasselbe, und wir würden dann Angesichts der Einfachheit und Schnelligkeit der Agglutination sicherlich den Vorzug vor dem Thierversuch geben und uns mit dieser begnügen. Ich habe daher, um diese Frage zu lösen, folgenden Weg beschritten. Wenn wir einem Thiere Bakterien oder Bakterienproducte injiciren, so erhalten wir im Serum specifisch lösende und agglutinirende Eigenschaften. Falls diese beiden Phänomene seitens völlig verschiedener Substanzen hervorgerufen werden, so muss es gelingen, nach Ausschaltung eines Theiles, beispielsweise der agglutinogenen Substanz in den Bakterien bezw. deren Producten, ein Serum zu erzielen, das unverändert stark lösende Eigenschaften, dagegen eine sehr verminderte agglutinirende Fähigkeit zeigt, ohne dass dieser letztere Mangel auf Bildung von Agglutinoiden beruht, wie dies bei sehr alten Seris der Fall ist. Zu diesem Versuche bediente ich mich alter Filtrate von *Pyocyaneus*culturen. Spritzt man einem Kaninchen 1 bis 2^{cem} eines solchen alten Filtrates in die Blutbahn, so zeigt nach 7 bis 8 Tagen das Serum dieses Thieres für *Pyocyaneus* bacillen specifisch lösende und agglutinirende Kraft. Es enthält also ein derartiges keimfreies Filtrat agglutinable Substanz, welche von den Bakterien herrührend in der Flüssigkeit gelöst ist, und die im Organismus zur Production des Agglutinins führt. Aus den obigen Versuchen ist ersichtlich, dass diese agglutinable Substanz einen Theil des Niederschlages bildet, der beim Mischen von agglutinirendem Serum mit Culturfiltraten entsteht, dass also die Möglichkeit gegeben ist, diese Substanz mit Hülfe agglutinirenden Serums zum grössten Theile auszufällen und zu entfernen.

Centrifugirt man eine derartige Mischung von hochwerthigem agglutinirendem *Pyocyaneus*serum, das durch Immunisiren von Thieren mit frischen *Agar*culturen von *Pyocyaneus* gewonnen wurde, und *Pyocyaneus*-Culturfiltrat nach eingetretener Präcipitation von dem gebildeten Niederschlage ab und prüft die klare Flüssigkeit an Thieren, so ist diese noch giftig und erzielt bei Thieren active Immunität; denn, wie ich in einer früheren Arbeit gezeigt habe, besitzt das *Pyocyaneus*serum, welches durch frische lebende Culturen erzeugt wird, nur baktericide, indessen keine antitoxische Kraft. Ein solches Serumfiltratgemisch, aus dem wir die präcipitirte agglutinable Substanz durch Centrifugiren entfernt hatten, wurde nunmehr Kaninchen intravenös injicirt; einer Parallelreihe von Kaninchen wurden die entsprechenden Mengen unveränderten Culturfiltrates auf die gleiche Weise einverleibt und nach einiger Zeit bei beiden Versuchsreihen der baktericide und agglutinirende Titer des Serums bestimmt, wie es die beifolgende Tabelle wiedergiebt.

Tabelle VI.

A. Vorbehandlung von Thieren mit Pyocyaneus-Filtrat, dessen agglutinable Substanz ausgefällt war.	B. Vorbehandlung von Thieren mit unverändertem Pyocyaneus-Filtrat.
Kaninchen I.	Kaninchen II.
23. I. 1902. 4 ^{cem} Pyocyaneus-Filtrat werden mit 2 ^{cem} Pyocyaneus-Immunserum von Ziege (rein baktericid) versetzt, Präcipitat abcentrifugirt. Von der klaren Flüssigkeit erhält obiges Kaninchen 3 ^{cem} entsprechend 2 ^{cem} Pyocyaneus-Filtrat intravenös.	23. I. 1902. 2 ^{cem} Pyocyaneus-Filtrat intravenös.
Serum des Kaninchens vor der Injection agglutinierte Pyocyaneus in Verdünnung 1:20 nicht.	Serum vor der Injection entzogen agglutinierte Pyocyaneus in Verdünnung 1:20 nicht.
31. I. Serum entzogen u. geprüft.	31. I. Serum entzogen u. geprüft.

Prüfung des Serums vorstehender Kaninchen.

Kaninchen I.

Agglutinations-Titer:

2. II. 1902. 1:20 agglutiniert Pyocyaneusbacillen unvollständig.
1:50 „ „ nicht.

Immunisirungs-Titer:

Meerschweinchen I.	Meerschweinchen II.	Meerschweinchen III.
2. II. 1902. 0.05 ^{cem} Ser. von Kaninchen I entzogen, am 31. I. gemischt mit einer halben Oese lebender Pyocyaneusbac. intrap.	2. II. 1902. 0.1 ^{cem} Ser. von Kan. I entzogen, am 31. I. gemischt mit einer halben Oese lebender Pyocyaneusbacillen intraperitoneal.	2. II. 1902. 0.1 ^{cem} Serum von Kaninchen I entzogen, am 23. I. vor der Vorbehandlung gemischt mit einer halben Oese lebend. Pyocyaneusbac. intraper.
5. II. †, im Peritoneum zahlr. Pyocyaneusbacillen.	Munter, lebt.	4. II. †.

Demnach Agglutinations-Titer: 1:20 unvollständige Agglutination,
Immunisirungs-Titer: 0.1^{cem} Serum gegen $\frac{1}{2}$ Oese Cultur.

Kaninchen II.

Agglutinations-Titer:

2. II. 1902. 1:20 agglutiniert Pyocyaneusbacillen vollständig,
1:50 „ „ „
1:100 „ „ „
1:200 „ „ unvollständig,
1:300 „ „ nicht.

Immunisirungs-Titer:

Meerschweinchen I.	Meerschweinchen II.	Meerschweinchen III.
2. II. 1902. 0.05 ^{cem} Ser.	2. II. 1902. 0.1 ^{cem} Ser.	2. II. 1902. 0.1 ^{cem} Serum
von Kaninchen II ent-	von Kaninchen II ent-	von Kaninchen II ent-
zogen, 31. I. gemischt mit	zogen, 31. I. gemischt	zogen, 23. I. vor der Vor-
einer halben Oese Pyoc.-	mit einer halben Oese	behandlung gemischt mit
Bacillen intraperitoneal.	Pyocyaneusbacillen	einer halben Oese Pyoc.-
5. II. abgemagert.	intraperitoneal.	Bacillen intraperitoneal.
7. II. †.	Munter, lebt.	4 II. †.

Demnach Agglutinations-Titer: 1:100 vollständig, 1:200 unvollst. Aggl.
Immunisirungs Titer: 0.1 ^{cem} Serum gegen 1/2 Oese Cultur.

Aus der vorstehenden Versuchsreihe erschen wir, dass bei beiden Thieren der Immunisirungswerth des Serums ungefähr gleich ist, dass dagegen bei dem Kaninchen I, welches Pyocyaneusfiltrat nach Ausfällung der agglutinablen Substanz erhalten hatte, der Agglutinationstiter ca. 10 Mal geringer ist, als bei Kaninchen II.

Ich habe diesen Versuch mehrmals (wiederholt und stets mit dem gleichen Resultate, dass dasjenige Thier, welches das Culturfiltrat erhielt, dem das Präcipitat entzogen war, eine weit stärkere Differenz im Agglutinationstiter als im Immunisirungswerth gegenüber dem mit unverändertem Filtrate vorbehandelten Thiere zeigte.

Nach den obigen Auseinandersetzungen müssen wir demnach auf Grund dieser Versuche annehmen, dass Agglutinin und Immunkörper, wenigstens beim *Bacillus pyocyaneus*, zwei völlig getrennte Substanzen sind, welche auch die haptophore Gruppe nicht gemeinsam haben, und dementsprechend für die Praxis Agglutinationsprobe und Immunitätsreaction (Pfeiffer'scher Versuch) als zwei gesonderte Reactionen betrachten.

III. Ueber Partialagglutinine.

Die wichtigste Frage bei den Agglutininen ist die nach ihrer Specificität, da diese direct in die Praxis der Bakteriologie eingreift. Indessen herrschen gerade darüber, selbst in den Kreisen der Fachbakteriologen, noch recht aus einander gehende Ansichten. Vielfach wird die Agglutination als „Gruppenreaction“ bezeichnet, die auch auf nahestehende andere Bakterienarten übergreift und daher nicht streng specifisch ist. In der That ist es zweifellos und durch vielfache Beobachter festgestellt, dass verschiedene, aber sehr nahestehende Bakterienarten, z. B. Rinder- und Menschentuberculose, Typhus und gewisse Stämme *Bacterium Coli*, innerhalb gewisser Grenzen durch das Agglutinin der anderen Art beein-

flusst werden. Hierzu kommt, dass andererseits Stämme ein und derselben Species, z. B. Typhusbacillen mit ein und demselben Typhusagglutinin in quantitativer Beziehung ungemein verschieden reagiren. So ist es jedem, der sich viel mit Agglutination von Typhusbacillen beschäftigt hat, bekannt, dass es Stämme von echtem Typhus giebt, die von einem Typhusserum bereits in einer sehr starken Verdünnung vollständig agglutiniert werden, während andere, eben so sichere Typhusstämme (sog. „schwer agglutinable“) oft einer 5- bis 10fach höheren Concentration bedürfen, um völlig agglutiniert zu sein.

Diese Thatfachen haben bereits Durham¹ dazu geführt, eine Theorie aufzustellen, die sich mit den Befunden deckt, die Ehrlich und Morgenroth² für den Immunkörper feststellen konnten. Ehrlich und Morgenroth konnten nämlich für den hämolytischen Immunkörper nachweisen, dass derselbe nicht eine einheitliche Substanz ist, sondern sich aus vielen Einzel- oder Partialimmunkörpern zusammensetzt, deren jeder einem Receptor im Blutkörperchen entspricht. Es ist also der Gesamtimmunkörper das Reactionsproduct aller Receptoren im Blutkörperchen, die in dem zur Vorbehandlung gewählten Thiere abstossungsfähige Gegengruppen fanden.

Demgemäss hängt die Specificität eines Serums davon ab, ob zwei Zellenarten gemeinsame Receptoren besitzen oder nicht. Im ersteren Falle wirkt das Serum auf beide, im letzteren Falle nur auf diejenige, mittels welcher das betreffende Serum producirt wurde.

Ich habe nach dieser Richtung auch die Agglutinine untersucht und zwar wählte ich hierzu als Versuchsobject *Bacterium coli*. Diese Bakterienart ist zu derartigen Untersuchungen ganz besonders geeignet, da die verschiedenen Stämme von *Bacterium coli* einem agglutinirenden Serum gegenüber, das mit einem Stamm *Bacterium coli* bereitet wurde, ein gänzlich verschiedenes und regelloses Verhalten zeigen. Es liegt hierüber eine grosse Litteratur vor, aus der übereinstimmend hervorgeht, dass ein agglutinirendes Coliserum, das beispielsweise Stamm A agglutiniert, Stamm B nicht, Stamm C erst in hohen Concentrationen agglutiniert u. s. w. Wenn wir uns daher bei *Bacterium coli* strenge auf den Boden der bisherigen Specificität des Serums stellen wollten, so müssten wir zu dem Schlusse gelangen, dass es viele Milliarden verschiedener Coliarten giebt. Denn selbst die Colibakterien ein und desselben Individuums zeigen ein derartig verschiedenes Verhalten in Bezug auf Agglutination durch ein Serum. Ich will auf diesen Punkt hier nicht näher eingehen, da

¹ Durham, *Journal of experim. Med.* 1901.

² Ehrlich und Morgenroth, *Berliner klin. Wochenschrift.* 1901.

Hr. Dr. Totsuka, der sich auf meine Veranlassung speciell mit den Fragen der Agglutination von *Bacterium coli* befasst hat, in einer nachfolgenden Arbeit ausführlich hierüber berichten wird.

Dieses so regellose Verhalten der einzelnen *Bacterium coli* Stämme in Bezug auf Agglutination findet seine Erklärung, wenn wir für das Agglutinin von *Bacterium coli* nachweisen können, dass es sich aus einzelnen Partialagglutininen zusammensetzt. Dementsprechend besteht dann auch die agglutinable Substanz im *Bacterium* aus einzelnen kleinsten Elementen, Receptoren, deren jedes ein Partialagglutinin erzeugt. Besitzen zwei Stämme *Bacterium coli* völlig gleiche solcher Elemente, so werden sie beide von demselben Serum gleichmässig agglutiniert, besitzt Stamm B nur wenige mit A gemeinsame Receptoren, so wird er von A Serum nur in hohen Concentrationen verklumpt, besitzt er eine höhere Anzahl, so wird er bereits von geringeren Concentrationen des A-Serums agglutiniert u. s. w.

Um den experimentellen Nachweis für eine derartige Zusammensetzung des Agglutinins zu liefern, habe ich eine Versuchsanordnung befolgt, die bereits von Ehrlich und Morgenroth zur Lösung einer solchen Frage in Vorschlag gebracht wurde.

Wenn nämlich thatsächlich die gesammte agglutinable Substanz einer Bakterienzelle aus vielen Einzeltheilen sich zusammensetzt, so ist im Sinne der Ehrlich'schen Auffassung und wie dies bereits Ehrlich und Morgenroth zum Ausdruck brachten, anzunehmen, dass nicht alle diese Einzeltheile in verschiedenen thierischen Organismen die völlig gleichen Receptoren finden. Es wird also unter diesen Umständen der gleiche Stamm A, sofern wir mit ihm verschiedene Thierspecies, z. B. Kaninchen, Meerschweinchen, Taube u. s. w. vorbehandeln, ein Serum liefern, das je nach der Thierart gewisse Verschiedenheiten zeigt.

Um dieses zu entscheiden, bin ich in folgender Weise vorgegangen. Es wurden mehrere Kaninchen, Meerschweinchen und Tauben mit ein und demselben Colistamme I vorbehandelt. Alsdann wurde das Serum dieser Thiere an 15 verschiedenen Colistämmen auf Agglutination geprüft.

Bei dieser Prüfung ergab sich nun thatsächlich eine Verschiedenheit der drei Serumarten, obgleich sie mit ein und derselben Cultur gewonnen worden waren. So agglutinierte das Kaninchenserum I in Verdünnung 1:100 ausser Coli I, mit dem das Thier vorbehandelt worden war, noch Stamm Coli 10 und Coli 14. Das Meerschweinchenserum I, das ebenso stark wirksam gegen Coli I war, wie das Kaninchenserum, agglutinierte selbst in Verdünnung 1:50 keinen der übrigen 15 Stämme. Das Taubenserum I endlich agglutinierte nicht Stamm 10 und 14, welche vom Kaninchenserum I verklumpt worden

waren, wohl aber Stamm 7, der im Gegensatze hierzu von keinem der anderen Sera I agglutiniert wurde.

Aus dieser Versuchsreihe, welche in ausführlicherer Weise Hr. Dr. Totsuka bringen wird, ersehen wir also nach den obigen Darlegungen, dass thatsächlich das Agglutinin entsprechend den einzelnen Theilen der agglutinablen Substanz sich aus Einzel- oder Partialagglutininen zusammensetzt und dass demnach ein Bakterienagglutinin je nach der biologischen Beschaffenheit des Thieres, von dem es gewonnen wurde, in seiner Constitution schwanken kann.

Auf Grund dieser Thatfachen können wir nunmehr auch an die Beantwortung der oben erwähnten Streitfrage, ob die Agglutination eine streng spezifische oder eine „Gruppenreaction“ ist, gehen. Nach dem soeben Auseinandergesetzten wird ein Serum A dann eine andere Bakterienart B agglutinieren, sofern dasselbe eine genügende Menge Partialagglutinine besitzt, die zu B einpassen. Dieses Verhältniss und Vorkommen ist nach den bisherigen Untersuchungen für die verschiedenen Bakterienarten ein sehr verschiedenes. Während nach den Untersuchungen von R. Koch die verschiedenen zur Tuberculosegruppe gehörigen Arten fast stets eine genügende Menge gemeinsamer Partialagglutinine besitzen, so dass ein Serum A, stets auch Species B, C u. s. w. agglutiniert und präcipitirt, ist dies beispielsweise für Typhus und *Bacterium coli* weit seltener. Hier ist das Verhalten derart, dass ein Typhusserum die weitaus grösste Anzahl von *Bacterium coli* Stämmen selbst in starken Concentrationen unbeeinflusst lässt. Allerdings ist nicht in Abrede zu stellen, dass es einzelne Colistämme giebt, welche von Typhusserum in weit stärkeren Verdünnungen als von normalem Serum agglutiniert werden, wie dies von Mauro Jatta¹, Beco², Sternberg³ und Anderen bereits beobachtet wurde. In diesen Fällen handelt es sich dann um eine Anzahl gemeinschaftlicher Partialagglutinine zwischen Typhusbacillen und den betreffenden Coliarten, und es wäre unrichtig, deshalb das Typhusagglutinin als eine „Gruppenreaction“ für nahestehende Coliarten zu erklären; denn es ist ebenso leicht möglich, dass auch ein anderer Mikroorganismus, der überhaupt nicht zur Coligruppe gehört, einige gemeinschaftliche Partialagglutinine mit Typhus besitzen und dann ebenfalls von Typhusserum stärker als von normalem agglutiniert werden kann. Die Antwort auf die obige Streitfrage kann demnach überhaupt nicht in einer für alle Bakterienarten

¹ Mauro Jatta, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXXIII.

² Beco, *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXVI.

³ Sternberg, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXXIV.

einheitlich gültigen Weise gegeben werden. Denn während, wie wir sahen, bei der Tuberculosegruppe ein constantes Vorhandensein von grossen Mengen gleichartiger Partialagglutinine die Differenzirung der verschiedenen Arten mittels der Agglutination unmöglich macht, treffen wir bei Typhus und Coli in sehr seltenen Fällen eine so reichliche Anwesenheit von gleichen Partialagglutininen, dass die Differenzirung schwierig wäre, und ebenso ist es möglich, dass bei anderen Bakterienarten überhaupt keine oder so wenige gleichartige Partialagglutinine auftreten, z. B. bei Pest (Kolle), dass auch nächststehende Arten von dem betreffenden Agglutinin nicht beeinflusst werden. In dieser Hinsicht muss nicht nur jede Bakterienart für sich genau betrachtet werden, sondern es kann dabei nach den obigen Versuchen selbst die Thierart, von welcher das Serum stammt, ob von Kaninchen, Ziege, Pferd u. s. w., eine Wichtigkeit haben, indem bei dem einen Thiere sich etwas andere Partialagglutinine bilden, als bei dem anderen.

Die praktisch wichtigste Frage ist nun die, ob wir bei Bakterienarten, bei denen ein solches Vorkommen von gleichen Partialagglutininen sicher nachgewiesen ist, wie z. B. bei Typhus und Coli, trotzdem mittels der Agglutination eine sichere Differenzirung durchführen können. Diese Frage ist nach meinen Erfahrungen zu bejahen, allerdings müssen die Anwendungsregeln der Agglutinationsprobe, wie sie jetzt meistens in der bakteriologischen Praxis üblich sind, geändert werden.

In dieser Beziehung ist zuerst erforderlich, dass jedes Serum, z. B. Typhusserum, das zur Agglutinationsprobe verwendet wird, vollständig auf seinen Endwerth austitriert wird. Da die gemeinsamen Partialagglutinine stets nur einen Theil des Gesamttagglutinins ausmachen, so sind sie in den dem Endwerthe eines Serums nahestehenden Verdünnungen in weit geringerer Menge vorhanden, und diese Endverdünnungen sind daher weit specifischer als die concentrirteren Serumlösungen. Es ist daher nicht angängig, wie es bisher vielfach geschieht, eine bestimmte Verdünnung, z. B. 1:100 oder 1:200, für Typhusserum zur Differenzirung mittels der Agglutination anzugeben. Vielmehr richtet sich die anzuwendende Verdünnung völlig nach der Wirkungshöhe des Serums. Von einem Serum, dessen Wirkungsgrenze bei 1:500 liegt, wird eine Verdünnung 1:400 geeignet sein, bei einem Serum, dessen Wirkungswerth 1:20000 ist, wäre eine Verdünnung 1:400 noch so concentrirt, dass in ihr etwaige vorhandene gleiche Partialagglutinine noch in zu grossen Mengen vorhanden wären.

Es lässt sich also als allgemeine Regel aufstellen, dass wir bei der Agglutination stets mit den Verdünnungen arbeiten müssen, welche sich nicht zu entfernt von dem für die be-

treffende Bakterienspecies austitirten Grenzwerthe bewegt. Eine positive Agglutination ist nach meinen Erfahrungen alsdann unbedingt entscheidend für die Zugehörigkeit zu der Species, mit welcher das serumliefernde Thier vorbehandelt worden war.

Wenden wir uns nunmehr zur Betrachtung der Frage, ob ein negativer Ausfall bei dieser Ausführung der Agglutination entscheidend ist gegen die Zugehörigkeit zu der betreffenden Species, so kommen hierbei die sogen. „schwer agglutinablen“ Vertreter mancher Bakterienarten in Betracht. Schon oben ist darauf aufmerksam gemacht worden, dass sich die einzelnen Stämme einer Bakterienart recht verschieden auf Agglutinabilität verhalten können. In weitaus der grössten Anzahl der Fälle sind freilich die Unterschiede keine sehr bedeutenden, in vereinzelt Fällen indessen sind mir Differenzen bis zum 10fachen vorgekommen, so dass ein Serum, das gewöhnliche Typhusstämme in Verdünnung 1:10000 agglutinierte, einen derartig schwer agglutinablen erst bei 1:1000 völlig verklumpte. Diese vereinzelt Fälle, welche beim Arbeiten mit den dem Grenzwerthe für Durchschnittsstämme nahen Verdünnungen negative und erst bei stärkeren Concentrationen positive Reactionen ergeben, können bei der Deutung Schwierigkeiten bereiten, da sich ihrer Agglutinationsfähigkeit bereits die Vertreter fremder Species nähern, welche gemeinsame Partialagglutinine im Serum besitzen.

Für solche, wie gesagt, stets sehr vereinzelt Fälle möchten wir auf Grund von Versuchen, welche Hr. Dr. Totsuka berichten wird, empfehlen, an die Stelle der sichtbaren Agglutination die quantitative Bestimmung der gebundenen Agglutininmengen zu setzen. Eine fremde Bakterienspecies, welche von einem heterologen Serum agglutiniert wird, vermag aus diesem naturgemäss nur die ihr gemeinsamen Partialagglutinine zu binden, nicht aber das Gesamtagglutinin, wie die homologe Bakterienart. Demgemäss entzieht eine fremde Bakterienspecies, auch wenn sie agglutiniert wird, dem heterologen Serum keine nennenswerthen Mengen an Gesamtagglutinin, dessen Titer daher nach Abcentrifugiren einer solchen heterologen Species fast unverändert bleibt. Dagegen entzieht, besonders bei Anwendung concentrirterer Verdünnungen, die homologe, wenn auch schwer agglutinirbare Species, grosse Mengen des Gesamtagglutinins, so dass nach Abcentrifugiren der Titer des Serums ungemein stark herabgesetzt ist. Auf diese Weise gelingt es demnach auch in diesen, allerdings praktisch seltenen Fällen, in welchen z. B. eine Bakterienart, welche alle sonstigen Charakteristica des Typhusbacillus besitzt, aber in Folge ihrer schweren Agglutinabilität zu Zweifeln gegen-

über manchen Coliarten Anlass geben kann, die specifische Diagnose mittels des agglutinirenden Serums zu stellen.

Aus alledem ersehen wir indessen, dass das Agglutinationsphänomen ein sehr complicirter Vorgang ist, der, um einwandfreie Resultate zu geben, sachverständige Ausführung unter genauer Kenntniss der möglichen Fehlerquellen erfordert. Alter der Cultur, Alkalescens des Nährbodens, auf welchem die zu prüfenden Bakterien gewachsen sind, Alter des Serums wegen der Agglutinoidbildung, Höhe des Serums, Art der zur Verdünnung des Serums gewählten Flüssigkeit, verschiedene Agglutinabilität der Bakterien, Grad der Serumverdünnung und andere Punkte mehr haben, wie wir im Verlaufe dieser Arbeit sahen, eine grosse Wichtigkeit, so dass die Agglutination wohl in den Händen eines erfahrenen Bakteriologen eine zuverlässige Identificierungsmethode ist, bei mangelnder Erfahrung auf diesem Gebiete aber allerdings sehr leicht zu Fehlschlüssen führen kann.