

[Institut für Bakteriologie zu Brüssel. — Parc Léopold.]

Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination.

Von

A. Joos,
Docteur en sciences.

Erster Theil.

Erscheinungsbedingungen und Rolle der Salze.

Die Agglutination, deren inneren Mechanismus wir erforschen wollen, ist jene Erscheinung, welche sich in vitro ergiebt, wenn man einer Bakterienemulsion eine hinreichende Dosis von Serum beifügt, welches von einem gegen die in der Emulsion befindlichen Mikroben immunisirten Thiere her stammt.

Diese Erscheinung ist im innersten Zusammenhange mit der gleichartigen Erscheinung, welche sich im Organismus vollzieht, und die unter dem Namen Pfeiffer'sches Phänomen bekannt ist.

Ebenso betrachtet man im Allgemeinen heute die Agglutinationserscheinung als eine sichtbare Wirkung der Widerstandsmittel, welche der Organismus dem Einströmen der Mikroben entgegensetzt. Dies ist thatsächlich die erste Phase des Phänomens Pfeiffer in vitro.

Man hat über die innere Natur des Agglutinationsvorganges vielfach gestritten; keine einzige der zu ihrer Erklärung aufgestellten Hypothesen vermag die Aufgabe vollständig zu lösen.

Wir interessirten uns dafür, die Erscheinungsbedingungen im Einzelnen und insbesondere die Rolle des Chlornatrium zu studiren. Wir konnten auf dem Wege des Experimentes nachweisen, dass die Rolle des Kochsalzes activ ist, und dass es in keiner Weise die Beziehungen zwischen

den Molecularattractionen ändert, die sich in der Mischung befinden. Indem wir uns auf das Ergebniss genauer, durch länger als zwei Jahre fortgesetzter Untersuchungen stützten, konnten wir nachweisen, dass sich die Agglutinationserscheinung auf eine **chemische Verbindung** zurückführt, und dass das Ergebniss dieser Verbindung die Bildung eines **neuen Körpers ist**, dessen specifischen Charakter wir im Nachstehenden erörtern wollen.

§ I. Die Erscheinungsbedingungen. Die Rolle des Chlornatrium.

Wenn man, wie wir oben sagten, die zahlreichen Arbeiten überblickt, welche über die Agglutination der Mikroben durch die specifischen Sera publicirt worden sind, so findet man, dass die Autoren, welche die Ursache dieser wichtigen Erscheinung bestimmen wollten, unter einander im höchsten Grade uneinig sind. Halten wir uns zunächst gegenwärtig, dass der relative Werth der verschiedenen für das Zutagetreten der Erscheinung erforderlichen Elemente noch wenig bekannt ist. Die Einen ziehen bloss die specifischen Substanzen in Betracht, welche in den Bakterienzellen und im Serum enthalten sind. Andere haben einen dritten, nicht specifischen Factor eintreten lassen, das Chlornatrium.

Wie immer es sich verhalten möge, so ist es bekannt, dass die Agglutination jedes Mal auftritt, wenn drei Factoren zusammen wirken. Diese Factoren sind: die Zellersubstanz der Mikroben, das Serum und das Salz.

Die Gegenwart dieser drei Factoren ist unerlässlich; fehlt einer von ihnen, so kann die Erscheinung nicht auftreten. Die Nothwendigkeit der beiden ersten Factoren ist evident; die Wichtigkeit des Salzes ist weniger anerkannt. Daher stellten wir uns zunächst die Aufgabe, die Rolle zu erforschen, welche ihm zuzuschreiben ist.

Die erste Frage, um deren Lösung es sich handelt, kann folgendermaassen formulirt werden: Vollzieht sich die Agglutination ohne Zusatz von Salz?

Um darauf antworten zu können, müssen wir zunächst damit beginnen, einerseits eine vollkommen salzfreie Mikrobenaufschwemmung zu erhalten; andererseits eine Serumlösung, welche gleichfalls ganz frei von Chlornatrium ist.

Wenn man in destillirtem Wasser eine Agarcultur von Typhusbacillen aufschwemmt, so erhält man in der Lösung immer auch eine gewisse Menge von Salzen, welche dem Agar entnommen sind, oder von dem condensirten Wasser am Boden der Tube herrührt. Zudem enthalten die

Bakterienleiber immer eine genügend beträchtliche Menge von Salz, so dass sich die Agglutination durch die Beifügung von Serum ergibt.

Diese Typhusemulsion in destillirtem Wasser kann uns demnach bei unseren Versuchen nicht dienen, und wir müssen suchen, ein Material zu erhalten, in welchem auch die genaueste Analyse die Gegenwart irgend einer mineralischen Substanz nicht erkennen lässt.

Wir konnten dieses Resultat auf zweierlei Art erhalten:

A. Durch die Waschung der Bacillen mit sterilem destillirten Wasser:

Einige Agarculturen werden in destillirtem Wasser aufgeschwemmt und hierauf energisch centrifugirt. Der Niederschlag wird in Wasser angerührt und neuerdings centrifugirt. Die Operation wird so lange wiederholt, bis einige Cubikcentimeter der Emulsion, die mittels einer sterilisirten Pipette entnommen wurden, keine Spur von Salz mehr enthalten. Diese Methode bietet gewisse Unannehmlichkeiten: sie erfordert viele Zeit, weil die lebenden Typhusbacillen sich sehr schwer centrifugiren lassen; wenn man die Mikroben zuerst mittels Toluol oder Chloroform tödtet, so stellt sich der Niederschlag leichter ein.

Uebrigens erlangt man mit den kleinen Centrifugen der Laboratorien (Centrifuge für Hand- oder für Wasserbetrieb) stets nur einen unvollständigen Bodensatz und daher einen sehr beträchtlichen Substanzverlust.

Weiter kann die Behandlung mit einer verhältnissmässig grossen Wassermenge während einer ziemlich langen Zeit nicht ohne schädlichen Einfluss bleiben und die chemische Zusammensetzung der Bakterienzellen alteriren.

Deshalb haben wir eine einfachere Methode angenommen, welche diese Unannehmlichkeiten nicht bietet und uns fortwährend gute Resultate ergeben hat, nämlich die Dialyse.

B. Durch die Dialyse.

Der Apparat, welchen wir im Allgemeinen anwenden, ist ein kleiner Dialysator von $3\frac{1}{2}$ cm Breite und 10 cm Höhe, auf ein Glasrohr zugerichtet, welcher angepasst und mittels eines Wattepfropfens geschlossen ist. Das Ganze wird bei einer Temperatur von 100° sterilisirt (Koch'scher Dampfsterilisator). Wir führen daselbst eine dichte Aufschwemmung von Typhusbacillen ein, welche der Art präparirt ist, dass $1\frac{1}{2}$ bis 2^{cem} Emulsion einer Agarcultur entsprechen. Alles wird in destillirtes, häufig erneuertes Wasser gestellt, oder, was noch besser ist, in ein eigenes Gefäss „ad hoc“,

In welchem wir einen langsamen Durchstrom von destillirtem Wasser unterhalten. Mittels dieser Anordnungen erhält man in sehr kurzer Zeit eine Emulsion von Typhusbacillen, welche vollständig salzfrei ist.

Wenn diese Operation gut durchgeführt ist, so alterirt sie in Nichts die Vitalität der Mikroben.

Wenn man einige Oesen der Emulsion auf Agar überträgt, so constatirt man, dass sie rein geblieben ist, und dass die Bakterien sich sehr gut entwickeln. Unter dem Mikroskope im hängenden Tropfen untersucht, sind die Bakterien sehr beweglich; sie lassen sich sehr leicht durch die gewöhnlichen Färbemethoden färben und die Methode der Geisselfärbung zeigt, dass diese Organe gleichfalls intact sind.

Hat man einmal diese salzlosen Bacillenemulsion erhalten, so handelt es sich darum, gleichfalls eine salzfreie Lösung von specifischem Serum zu gewinnen. Wenn das Serum sehr activ ist, dann genügt es wohl häufig, dasselbe mit destillirtem Wasser auf die gewünschte Verdünnung zu bringen, um die Wirkung der aufgelösten Salze nicht mehr fühlbar erscheinen zu lassen. Wenn das Serum jedoch wenig activ oder von mittelmässiger Stärke ist, so ist es unerlässlich, dasselbe mittels der Dialyse von allen krystalloiden Substanzen zu befreien, welche es enthält. Wir wenden zu diesem Behufe denselben Apparat an, der uns zur Dialyse der Bakterienemulsion gedient hat.

Die agglutinirende Kraft des Serums wird durch die Dialyse wenig beeinflusst; denn man weiss übrigens, dass das Agglutinin nicht dialysirbar ist. Wenn man Sorge getragen hat, die Ursachen der Verunreinigung zu vermeiden, so constatirt man, dass das Serum, welches während mehrerer Tage dialysirt hat, nichts von seiner agglutinirenden Kraft eingebüsst hat. Höchstens kann man bisweilen bemerken, dass die Agglutination sich ein wenig langsamer in den Tuben vollzieht, welche dialysirtes Serum enthalten, als dies in den Tuben erfolgt, welche das gewöhnliche Serum einschliessen.

Wenn wir einerseits das dialysirte Serum und andererseits die dialysirte Bakterienemulsion besitzen, so haben wir die gewünschten Elemente, um die Rolle zu studiren, welche die Salze in der uns beschäftigenden Erscheinung spielen.

1. Kann sich die Agglutination ohne Beisein der Salze, durch die directe Einwirkung der specifischen Serums substanz auf die mikrobe Zellen substanz vollziehen?

Versuch A. Nehmen wir ein Reagensglas, in welches wir 2^{cem} einer dialysirten Typhusbacillenaufschwemmung, ungefähr einer Agarcultur entsprechend gegossen haben. Wir fügen eine Dose von vollständig salz-

freiem Serum bei, welche hinreicht¹, um unter gewöhnlichen Umständen eine rapide Agglutination hervorzurufen (d. h. wenn 0.7 Procent NaCl vorhanden ist), und eine Menge Wasser, welche hinreicht, um 10^{ccm} zu machen. Setzen wir dies alles in den Brutschrank und belassen es durch zwei Stunden bei einer Temperatur von 37°. Nach Ablauf dieser Zeit constatiren wir, dass die Emulsion vollkommen homogen geblieben ist und keine Spur von Flocken oder einem Niederschlage zeigt. Untersucht man die Mischung 24 oder 48 Stunden später, so sieht man, dass nichts geändert ist und dass die Flüssigkeit immer gleichmässig trübe bleibt.

Wenn wir die Serumdosis vermehren, wenn wir sie auf das Doppelte, Dreifache, Fünffache u. s. w. erhöhen, so bemerken wir darum doch nicht, dass die Bacillen sich mehr agglutiniren.

Die beiden Elemente, Bacillenkörper und spezifische Serums substanz, welche ursprünglich zu genügen scheinen, um die Agglutinationserscheinung hervorzurufen, erzeugen sie nicht. Die agglutinirende Serums substanz zeigt sich bei diesem Experimente vollkommen unthätig und es ist klar, dass es eines dritten Körpers bedarf, um das Phänomen hervorzurufen.

Diese dritte Substanz, welche den spezifischen Substanzen ihre Activität zurückgeben soll, kann keine andere als das Salz sein, da wir wissen, dass eine Typhusbacillenaufschwemmung in physiologischer Lösung sich rasch unter der Wirkung des Serums agglutinirt.

Und in der That genügt es, dem Gemisch eine Spur von Salz beizumengen, um die charakteristischen Flocken sich bilden zu sehen. Dieser Versuch zeigt daher, dass der Agglutinationsvorgang nur dann auftreten

¹ Die Serumdosen, welche zur Agglutination hinreichen, können sehr verschieden sein. Wenn 0.001 Serum eine Cultur agglutinirt, können 0.002, 0.003 u. s. w. gleichfalls eine Cultur in derselben Zeit wahrnehmbar agglutiniren. Wir werden unter einfacher agglutinirender Dosis die Minimaldosis von Serum verstehen, welche in einer Typhusemulsion (einer Cultur in 10^{ccm}) in ungefähr 20 bis 30' grobe charakteristische Flocken erzeugt. Die Tube darf nach Verlauf einer halben Stunde nur mehr dichte Flocken enthalten, welche anfangen, sich abzusetzen, derart, dass der Niederschlag in weniger als einer Stunde vollständig ist. In diesem Falle sieht man die ersten kleinen Flöckchen erst nach einem Contact von 5 bis 10 Minuten erscheinen. Vollzieht sich die Agglutination rascher, so erachten wir, dass die beigefügte Dosis Serum zu stark war.

Wir haben diese Einheit angenommen, weil der Agglutinationsvorgang unter diesen Bedingungen am typischsten ist. Ist die Agglutination zu schnell ist, so verfolgt man zu schwer ihre Phasen; ist sie dagegen zu langsam, so verliert sie die Präcision. Mit einer Serumdosis, welche eine Cultur in 2 Stunden agglutinirt (die von mehreren Autoren angenommene Grenze), erfasst man nicht gut den Beginn der Erscheinung; die ersten kleinen Flocken sind fast unmerklich, und der Niederschlag vollzieht sich zu langsam.

kann, wenn drei Substanzen zusammentreten. Diese Substanzen sind die agglutinirbare Mikrobensubstanz, die agglutinirende Serumschubstanz und das Salz. Fällt eine von ihnen aus, so wird die Agglutination unmöglich.

Unter diesen drei Substanzen finden wir zwei spezifische, die agglutinirbare und die agglutinirende Substanz, und eine andere, nicht spezifische, das Salz. Diese letztere ist ebenso unerlässlich als die beiden ersten, doch die Art ihres Einwirkens bleibt ein wenig dunkel.

Bevor wir untersuchen, welche Rolle die Salze in der Agglutinationserscheinung spielen, wollen wir die Aufmerksamkeit auf ein sehr interessantes Factum lenken.

Wir haben soeben gesehen, dass die spezifischen Substanzen keine Wirkung auf einander hervorrufen in Abwesenheit des NaCl. Mann könnte glauben, dass sie vollständig isolirt bleiben, die agglutinirende Substanz aufgelöst in der Flüssigkeit, und die agglutinbare Substanz unmodificirt im Bacillenleibe bleibt. Indessen verhält es sich nicht so. Die agglutinirende Substanz findet sich rasch durch die agglutinirbare gebunden und kann nicht mehr in der Lösung aufgefunden werden; jedoch ist der Anblick der Bacillen nicht modificirt. Dieses lässt sich leicht constatiren.

Wenn man ein wenig salzfreie Typhusemulsion in hängendem Tropfen unter dem Mikroskope untersucht und ihr eine Quantität ebenso salzfreie Serumlösung beigesetzt hat, welche hinreicht, um in Gegenwart von Chlor-natrium eine rapide Agglutination hervorzurufen, so sieht man, dass die Bacillen immer isolirt und beweglich bleiben. Nichts an deren äusserem Anblicke weist auf die Gegenwart der agglutinirenden Substanzen hin. Färbt man sie nach den gewöhnlichen Methoden, so unterscheidet sie nichts von den normalen Bacillen. Auf Agar oder in Bouillon eingesäet entwickeln sie sich rasch und die Geisseln lassen sich durch die üblichen Verfahren leicht färben.

Diese Bacillen dürfen indessen nicht mehr als normale Bacillen angesehen werden, da sie die agglutinirende Substanz absorbirt haben, welche sich in der Flüssigkeit befand.

Versuch B. Dieses Factum lässt sich leicht nachweisen, wenn man die salzfreie Mischung centrifugirt, oder noch besser, sie durch eine kleine Filtrirkerze filtrirt. Wenn man der filtrirten Flüssigkeit 0.7 Procent NaCl und eine Typhuscultur beifügt, so bemerkt man nicht die geringste Spur von Agglutination. Wenn sich demnach die agglutinirende Substanz in der Lösung nicht mehr wiederfindet, so muss zugegeben werden, dass sie sich auf den Bakterienzellen fixirt hat, da man weiss, dass sie leicht die der Filtrirkerze durchdringt.

Man kann übrigens direct nachweisen, dass die Typhusbacillen die agglutinirende Substanz binden, ohne selbst alterirt zu werden, wenn sich kein Salz in der Mischung befindet.

Versuch C. Man centrifugirt eine Mischung von dialysirter Emulsion und dialysirtem Serum. Sobald der Bakterienniederschlag sich gebildet hat, giesst man die oben schwimmende Flüssigkeit ab, wischt die Tube sorgfältig mit Filtrirpapien ab und rührt den Niederschlag in 10^{cem} physiologischer Lösung ein. Hier vollzieht sich nun eine rasche Agglutination. Die Flüssigkeit, welche man nach der Centrifugation von dem Bakterienniederschlag abgegossen hat, ergiebt, wenn man NaCl und eine Cultur beisetzt, keine Agglutination.

Diese Experimente thun daher dar, dass die agglutinirende und die agglutinirbare Substanz für einander eine starke Affinität besitzen. Ohne Salze einigen sie sich, fixiren sie sich auf einander, doch zeigt sich diese Einigung durch kein äusseres Merkmal. Man kann selbst Dosen von Serum beifügen, welche zwei oder drei Mal stärker sind als jene, welche unter normalen Umständen die Agglutination hervorruft, ohne dass die geringste Spur von agglutinirender Substanz in der filtrirten Flüssigkeit entdeckt werden kann. Es ist jedoch eine Grenze vorhanden, über welche hinaus die agglutinirende Substanz in das Filtrat eindringt. Eine bestimmte Menge von Mikroben kann sich nur mit einer begrenzten Quantität der agglutinirenden Substanz vereinigen; ist diese Quantität erreicht, so sind die Bakterien gesättigt, und was man noch hinzufügt bleibt ohne Verwendung. So erleiden Bakterien, welche eine beträchtliche Menge agglutinirender Substanz gebunden haben, unter der Wirkung derselben keine Modification. Sie behalten alle ihre mikroskopischen Merkmale, und ihre Aufschwemmung unterscheidet sich in Nichts von der gewöhnlichen. Die Einführung von NaCl, selbst in minimaler Quantität, ändert den Anblick der Mischung vollständig. Je nach der Menge des beigegeführten Salzes sieht man in den Tuben sich mehr oder weniger schnell Flocken bilden. Unter dem Mikroskope sieht man die Bakterien sich fast augenblicklich immobilisiren und sich in Haufen sammeln.

Dieser Versuch ist sehr interessant. Wenn man in einen hohlen Objectträger im hängenden Tropfen ein wenig Typhusemulsion mit Serum versetzt (alles dies vollkommen salzfrei), so sieht man die Bacillen sich nach allen Richtungen schnell bewegen. Wenn man nun vorsichtig einen Tropfen einer verdünnten NaCl-Lösung hinzufügt, so sieht man die Bacillen, welche vom NaCl erreicht wurden, sich sofort immobilisiren, und in wenigen Augenblicken sind alle Bakterien, welche sich in der Präparation befinden, vollkommen unbeweglich geworden.

Das Chlornatrium zeigt sich demnach hier als das wahrhafte Determinans der Erscheinung. Es genügt, eine Spur von NaCl mit den mit Agglutinin imprägnirten Bacillen in Contact zu bringen, um eine tiefgehende Aenderung in den Eigenschaften der letzteren sich vollziehen zu sehen. Diese Aenderung, welche in den Tuben erst am Ende einer gewissen Zeit sichtbar wird, ist jedoch eine sofortige, wovon man sich überzeugen kann, wenn man die Erscheinung, wie wir es gethan haben, unter dem Mikroskope beobachtet.

Der Bacillus, welcher lediglich Agglutinin enthält, erleidet keine wahrnehmbare Modification; sobald er aber gleichzeitig NaCl enthält, so erleidet er augenblicklich eine so tiefe und sofortige Aenderung, dass es den Anschein hat, als ob die eigenthümliche organische Natur des Bacillus vollständig verschwände und mit einem chemischen Niederschlage identisch würde. Diese Umwandlung vollzieht sich nicht (wir können diesen Punkt nicht genug betonen), im Augenblicke, wo sich das Agglutinin im Contacte mit der agglutinirbaren Substanz befindet, sondern erst im Momente, wo sich diese beiden mit dem Salze treffen. Es vollzieht sich sodann ein Phänomen, welches identisch ist mit demjenigen, welches die Bildung einer unlöslichen Verbindung in der Chemie begleitet. Es ist diese neue Verbindung, welche sich in den Tuben unter dem charakteristischen flockigen Anblicke darbietet.

Wenn wir die innere Seite dieses Phänomens betrachten, müssen wir zugeben, dass in einer salzfreien Bacillenemulsion die agglutinirende Substanz sich mit der agglutinirbaren verbindet, um eine lösliche Verbindung zu ergeben. (Wir sehen also die Bakterienaufschwemmung als eine echte Lösung an.) Fügt man dieser Verbindung eine bestimmte Quantität NaCl bei, so wird die Verbindung unlöslich und stellt sich sodann in der ihm eigenthümlichen Gestalt eines flockigen Niederschlages dar.

Die Salz mengen, welche genügen, um die Erscheinung hervorzubringen, sind so geringfügig, dass man naturgemäss veranlasst wird, die Existenz einer wahren chemischen Reaction zuzugeben. Es besteht keinerlei Missverhältniss zwischen dem Mengenverhältnisse des Salzes, dem Agglutinin und der agglutinirbaren Substanz, welche erforderlich, sind um den Niederschlag zu erzeugen. Diese Hypothese findet ihre Bekräftigung in dem folgenden Versuche:

Versuch D. Nehmen wir eine Anzahl von Tuben, in welche wir eine bestimmte Menge dialysirter Typhusemulsion geben und eine ebenso bestimmte Menge gleichfalls dialysirten Serum (eine Dosis, welche mit 0.7 Procent NaCl eine rapide Agglutination ergeben würde) hinzufügen und so viel Wasser beimengen, als zur Ausfüllung von 10^{ccm} nöthig ist.

Hierauf fügen wir gradweise steigende Dosen von NaCl 1, 2, 3 . . . 10 . . . 20, 50^{mg} und setzen das Ganze in den Brutschrank bei 37°.

Zu allererst bemerkt man, dass in den Tuben, welche nur wenig Salz enthalten, die ersten Flocken nur langsam zum Vorschein kommen, während sich die Anfangerscheinung in den anderen sehr rasch wahrnehmen lässt. Wenn man jedoch die Tuben am Ende einer gewissen Zeit untersucht, da keine Flocken mehr in der Flüssigkeit schweben und der ganze Niederschlag sich bereits zu Boden gesetzt hat, so sieht man, dass die Volumen dieses Niederschlages in sehr bedeutender Weise variiren. Er ist um so beträchtlicher, je mehr Salz in der Mischung enthalten ist. Es tritt übrigens ein Moment ein, wo er sich nicht mehr vergrössert, wenn auch die Salzmenge grösser wird, nämlich dann, wenn die Mischung einen Ueberschuss von Salz enthält und die ganze niederschlagbare Substanz durch die Menge des beigefügten Serums zum Niederschlage gebracht worden ist.

In den Tuben, welche wenig NaCl enthalten¹, bemerkt man eine gewisse Abstufung in dem Volumen des Niederschlages und es scheint dieser im Verhältnisse zu der Salzmenge zu stehen, welche die Mischung enthält. In den ersten Tuben, welche am wenigsten NaCl enthalten, ist der Niederschlag unvollständig, die oben schwimmende Flüssigkeit ist noch mehr oder weniger trübe. Wenn wir sie vorsichtig abgiessen und eine neue Menge NaCl beifügen, so erhalten wir eine neue Agglutination. Dies beweist, dass wohl Agglutinin und agglutininbare Substanz im Ueberschusse, jedoch zu wenig Salz vorhanden war, um das Ganze zum Niederschlag zu bringen.

Nach diesen Versuchen scheint daher eine beständige Beziehung zwischen den Substanzmengen, welche in die Verbindung eintreten, und der erhaltenen Niederschlagsmenge zu bestehen. Diese Beobachtungen sprechen offenbar zu Gunsten der chemischen Natur der Erscheinung. Wir werden in einem anderen Theile dieser Arbeit untersuchen, ob die Verbindung der erwähnten drei Substanzen eine wahre chemische Verbindung ist. Vorerst haben wir noch zu beweisen, dass das Salz thatsächlich in die Verbindung eintritt und dass seine Action die molecularen Attractionsverhältnisse der Mischung nicht modificirt.

¹ Diese enge Wechselbeziehung, welche zwischen zugegebener Salzmenge und dem erhaltenen Volumen des Niederschlages besteht, tritt nur dann zum Vorschein, wenn die beigefügte Dosis NaCl sehr gering ist. Ueber eine gewisse Grenze hinaus ist das Quantum utile für alle Tuben das gleiche, weil alsdann alle einen Ueberschuss enthalten und man keinerlei Unterschied in den Volumen der einzelnen Niederschläge mehr wahrnehmen kann.

§ II. Die Rolle des Salzes ist activ und nicht passiv.

Wir können auf zweierlei Art nachweisen, dass das Salz eine active Rolle in dem Agglutinationsvorgange spielt und dass durch sein Hinzutreten keineswegs eine Veränderung der Molekular-Attractionsbeziehungen der Mischung, so wie Bordet behauptet, verursacht wird. Wir werden beweisen:

1. Dass das Salz in die Verbindung der agglutinirenden und agglutinirbaren Substanz eintritt.

2. Dass die Agglutination sich selbst dann vollzieht, wenn in der Flüssigkeit, in welcher man das Phänomen erzeugt, kein Salz aufgelöst ist.

Wir haben bereits einige Versuche citirt, welche gestatten, das Eintreten des Salzes als ein Factum chemischer Ordnung zu betrachten. Wenn wir auf das im vorigen Paragraphen zuletzt erwähnte Experiment zurückgreifen, so können wir nicht nur darthun, dass das Volumen des Niederschlages im Verhältnisse zur beigefügten Menge von NaCl steht, sondern dass auch die Bildung des Niederschlages selbst in innerem Zusammenhange mit der Salzmenge sich befindet. Der Niederschlag vollzieht sich um so rascher, je beträchtlicher die Dosis NaCl ist.

Wenn wir eine Reihe von Tuben präpariren, welche je eine gleiche Menge von salzfreiem Serum und eben solcher Typhusemulsion enthalten, und wenn wir stufenweise steigende, jedoch immer nur sehr kleine Dosen NaCl hinzufügen, so constatiren wir, dass die Agglutination in dem Tubus, welcher wenig NaCl enthält, sehr langsam vor sich geht, während sie in denjenigen, welche mehr NaCl enthalten, viel rascher (und wie wir gesehen haben, viel vollständiger) ist. Dieser Versuch beweist allerdings noch nicht, dass das Salz thatsächlich in den gebildeten Niederschlag eintritt. Man weiss, dass gewisse physische Erscheinungen, wie z. B. die der Sedimentirung in enger Beziehung zu den Salzmenngen stehen, welche sich in der Lösung befinden. Die in der Flüssigkeit suspendirten Partikelchen setzen sich um so rascher ab, eine je grössere Quantität gewisser Salze sich in dieser Flüssigkeit gelöst finden. Indessen beobachtet man bei diesen Sedimentirungserscheinungen niemals einen so engen Zusammenhang zwischen der Menge der beigefügten Salze und der Schnelligkeit der Bildung oder dem Volumen des erhaltenen Niederschlages. Zudem bewirken sehr schwache Mengen von Salzen keinerlei Aenderung in der Mischung.

Um nachzuweisen, dass das Salz thatsächlich in die Verbindung eintritt, müsste man die Quantität, welche sich in der Lösung befindet, vor und nach der Agglutination dosiren können. Dieses Verfahren ist wenig praktisch, zunächst, weil die utilisirte Menge NaCl sehr

minimal ist, und zweitens, weil die Bakterien immer gewisse Theile der salzigen Substanzen absorbiren, welche in der Flüssigkeit, in der sie aufschwimmen, aufgelöst sind. Man müsste die Dosirung vervielfältigen und je nach der Differenz die Salzmenge berechnen, welche während der Agglutination absorbiert wurde. Da diese Mengen sehr minim sind, so sind zahlreiche Irrungen zu befürchten.

Die directe Nachsuchung und die Dosirung des in den agglutinierten Bakterienzellen enthaltenen NaCl im Verhältnisse zu der Menge des Salzes, welches Normalbacillen enthält, die durch eben dieselbe Zeit mit derselben Lösung in Contact waren, kann ebenfalls keine besseren Resultate ergeben.

Wir glauben, dass es genügen wird, nachzuweisen, dass die agglutinierten Bacillen mehr NaCl absorbiert haben, als die gewöhnlichen (Normal-) Bacillen, um zu beweisen, dass das Salz wirklich in die Verbindung eintritt.

Wir beweisen vorerst, dass das aufgelöste Salz aus der Lösung gezogen wird.

Versuch E. Nehmen wir eine Emulsion von Typhusbacillen mit Serum versetzt und absolut salzfrei. Fügen wir eine kleine Dosis von NaCl hinzu und setzen wir das Ganze während zwei Stunden in den Brutschrank; hierauf filtriren wir über einer kleinen Filtrirkerze. Wenn wir einen Tropfen NO_3Ag -Lösung der filtrirten Flüssigkeit beifügen, so sehen wir, dass die grössere Partie des Salzes verschwunden ist. Das Experiment wird besonders typisch, wenn man gleichzeitig eine andere Tube nimmt, welche dieselbe Dosis NaCl in derselben Quantität Wasser aufgelöst, jedoch keine Mikroben enthält. Wenn man dann der filtrirten Flüssigkeit und der NaCl-Lösung einen Tropfen von NO_3Ag hinzufügt, so bemerkt man einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Lösungen.

Da man uns wahrscheinlich einwenden wird, dass die Bakterienzellen die salzigen Substanzen absorbiren, welche in den Flüssigkeiten aufgelöst sind, in denen sie aufschwimmen, so können wir das Experiment noch präciser gestalten:

Versuch F. Nehmen wir drei Tuben, welche genau dasselbe Quantum NaCl enthalten. Setzen wir in die erste eine Typhuscultur in 2 oder 3^{cem} Wasser verdünnt (und vollständig salzfrei) und eine agglutinirende Dosis von gleichfalls salzfreiem Serum. Setzen wir in die zweite dieselbe Dosis derselben Emulsion, jedoch ohne Serum. In die dritte Tube setzen wir endlich weder Emulsion, noch Serum. Darauf setzen wir zu allen dreien so viel destillirtes Wasser, dass jede die gleiche Menge Flüssigkeit enthält. Nach zweistündigem Contacte verdünnen wir alle bis auf 10^{cem}

und filtriren alle durch eine kleine Porzellankerze. Den filtrirten Flüssigkeiten setzen wir einen Tropfen NO_3Ag -Lösung zu. Sofort constatiren wir eine beträchtliche Differenz des Anblickes, welchen sie darbieten. Die Flüssigkeit der ersten Tube wird kaum opalescent, die zweite ist schon viel trüber, die dritte zeigt eine sehr merkliche Trübung und selbst einen leichten Niederschlag, wenn die Menge NaCl nur ein wenig bedeutend ist.

Dieses Experiment zeigt uns demnach:

1. dass die Mischung von Bakterien und Serum im Zustande der Agglutination eine gewisse Menge des NaCl weggenommen hat, welches sich in Lösung befindet;

2. dass die der Lösung entzogene Menge von NaCl grösser als diejenige ist, welche eine dem Niederschlage gleiche Quantität von Bacillen-emulsion in derselben Zeit entziehen kann.

Bei diesen Versuchen versetzen wir das Salz und die Mikroben in sehr wenig Wasser (2 oder 3 cm^3), um eine typische Agglutination zu erzielen und um das Experiment noch genauer zu machen. Man muss hier mit sehr minimalen Quantitäten NaCl operiren (z. B. 1 mg auf 10 cm^3). Wenn wir dieses 1 mg in 2 cm^3 Emulsion setzen, so werden wir eine bestimmte Agglutination haben. Setzen wir es dagegen in 10 cm^3 , so wird die Agglutination unvollständig sein, da die Verbindung nicht genügend Salz vorfindet (dasselbe ist zu sehr verdünnt), um die ganze präcipitable Substanz niederzuschlagen. Man wird noch einen Unterschied wahrnehmen können zwischen der Flüssigkeit, in welcher sich die Agglutination vollzogen hat, und derjenigen, wo die Bakterien unverändert geblieben sind; jedoch dieser Unterschied ist weniger beträchtlich. Wenn wir andererseits mehr NaCl (0.01 in 10 cm^3 , um in denselben Proportionen zu bleiben) hinzufügen, so kann kein Unterschied mehr wahrgenommen werden, denn die Trübung ist in allen Tuben zu stark. Es bedarf sodann einer starken Verdünnung, um die Veränderung zu ermessen, welche in der Mischung aufgetreten ist, und auch da ist dieselbe fast immer unmerklich, da die Salzmenge, welche in die Verbindung eintritt, nur ein äusserst geringer Theil derjenigen ist, die sich in der Flüssigkeit aufgelöst findet.

Bei unserer *modus operandi* lassen wir der Mischung von Bakterien und Serum eine Quantität NaCl zukommen, welche genügt, um rapide und nahezu vollständige Agglutination herbeizuführen. Die Bacillen finden gleichfalls in der Lösung eine mehr als hinreichende Menge von NaCl , von der sie den ihnen nothwendigen Theil absorbiren. Beide (Bacillen und Serum und Bacillen allein) befinden sich demnach in vollkommen normalen Verhältnissen, und wenn wir verdünnen und hierauf rasch filtriren, so können wir sehr deutlich die Menge von NaCl schätzen, welche in beiden Fällen absorbirt wurde.

Nachdem dargethan worden ist, dass bei der Agglutination eine gewisse Menge von NaCl verschwindet, müssen wir zur Bekräftigung unserer Hypothese einer chemischen Verbindung auch nachweisen, dass die Menge von NaCl, welche aus der Lösung verschwindet, im selben Maasse zunimmt, als der Niederschlag sich schneller bildet und vollständiger ist.

Versuch G. Wenn wir auf die oben angezeigte Art zwei Tuben vorbereiten, deren eine 1^{ms} und deren andere 2^{ms} NaCl und welche die gleiche Menge Bacillenemulsion und Serum (einen Ueberschuss) enthalten, so sehen wir bald grobe Flocken sich bilden. Nach einigen Stunden Contact verdünnt man auf 10^{cem} und filtrirt rasch durch eine kleine Filtrirkerze. Gleiche Filtrate erhalten einen Tropfen NO₃Ag-Lösung. Man bemerkt, dass die beiden Flüssigkeiten dieselbe Trübung aufweisen; sie ist in der Lösung von 2^{ms} NaCl kaum noch wahrnehmbar als in derjenigen, welche nur die Hälfte enthält. Dies beweist, dass, wenn der Niederschlag vollständiger ist, mehr Salz dazu nöthig ist.

Es besteht demnach eine enge Beziehung zwischen dem erlangten Niederschlage und der Salzmenge, die nöthig ist, um ihn zu erzeugen.

Auch auf folgende Art kann bewiesen werden, dass das NaCl wirklich in die Verbindung von Agglutinin und specifischer mikrobe Substanz eintritt.

Versuch H. Nehmen wir eine salzfreie Typhusemulsion und fügen wir ihr eine nicht zu beträchtliche Dosis Serum und eine Menge NaCl bei, welche hinreicht, um die Agglutination hervorzurufen. Sobald sich der Niederschlag agglomerirter Bacillen am Grunde der Tube gesetzt hat, so centrifugiren wir energisch, um so einen compacten Bodensatz zu erhalten, giessen die oben schwimmende Flüssigkeit ab, trocknen die Wände der Tube sorgfältig mit Filtrirpapier ab; hierauf rühren wir den Niederschlag in destillirtem Wasser ein. Nun bildet sich keine Ablagerung.

Wenn wir jedoch durch die Filtrirkerze filtriren und das NaCl in der filtrirten Flüssigkeit suchen, so sehen wir, dass sich ein Theil des NaCl, das sich mit den Bakterien niedergeschlagen hat, wieder in der Flüssigkeit aufgelöst hat. Der Niederschlag hat demnach nicht mehr die Zusammensetzung, die er haben soll, doch genügt es, ihm das NaCl, welches er verloren hat, wiederzugeben, um ihn seine ursprüngliche Gestalt wieder annehmen zu lassen.

In der That, wenn wir der trüben Flüssigkeit NaCl beifügen, so sehen wir, dass sich wieder meist mehr grosse Flocken bilden, und zwar je nach der Menge des zugefügten Salzes. Ganz geringe Mengen genügen schon, um eine sehr rasche Reagglutination hervorzurufen.

Die logische Schlussfolgerung, welche aus diesem Versuche gezogen werden kann, ist offenbar folgende: Das NaCl tritt wahrhaftig in die Verbindung der agglutinirenden und agglutinirbare Substanz ein. Der so erhaltene Niederschlag ist ziemlich unbeständig, weil er einen Theil des NaCl, welches er enthält, an das Wasser abgibt. Es genügt jedoch, wenn man ihm dieses NaCl wiedergibt, um ihm gleichzeitig alle seine Eigenschaften zurückzugeben.

Das NaCl muss sich daher nicht in der Lösung, sondern in der Verbindung selbst befinden, um den Agglutinationsvorgang hervorzurufen.

Können wir nun dieses Factum in noch eclatanterer Weise darthun und die Agglutination in einer salzfreien Lösung erhalten? Dies ist möglich und wir werden es in der Folge beweisen. Vorher wollen wir jedoch einen interessanten Versuch erwähnen, welcher noch des Mehreren und zur Evidenz die active Rolle des Salzes darthut.

Versuch J. Nehmen wir 2^{cem} unserer dialysirten Typhusemulsion, setzen wir 1^{cem} verdünntes und dialysirtes Serum zu und halten wir das Ganze während zwei Stunden in den Brutschrank. Andererseits nehmen wir 2^{cem} derselben Emulsion, setzen 1^{cem} Wasser und 1^{cg} NaCl zu und halten dies gleichfalls während zwei Stunden in den Brutschrank. Am Ende dieser Zeit setzen wir der ersten Tube 7^{cem} destillirtes Wasser und 1^{cg} NaCl zu, der zweiten Tube hingegen 6^{cem} destillirtes Wasser und 1^{cem} verdünntes Serum und stellen dies alles in die Brützkammer zurück. Nach 25 bis 30 Minuten hat in der zweiten Tube die Agglutination begonnen, während in der ersten noch nichts zu bemerken ist.

Versuch I. Man kann dieses Experiment noch prägnanter gestalten, wenn man eine erste Serie von Tuben nimmt, welche 2^{cem} dialysirter Emulsion (salzfrei) und 1^{cem} verdünntes, salzfreies Serum enthalten. In einer zweiten Reihe setzen wir 2^{cem} Emulsion und variable Mengen von NaCl (z. B. 1, 2, 5, 7 . . . 10^{mg}) an. Nach zweistündigem Contacte fügt man der ersten Serie NaCl (1, 2, 5, 7 . . . 10^{mg}) und der zweiten verdünntes Serum (1^{cem}) bei und giesst destillirtes Wasser auf, bis in allen Tuben 10^{cem} enthalten sind. In den Tuben der zweiten Serie vollzieht sich die Agglutination rasch; jene welche 10 und 7^{mg} NaCl enthalten, zeigen schon kleine Flöckchen in der Flüssigkeit, während die entsprechenden Tuben der ersten Serie einförmig trübe sind und keine Veränderung aufweisen. Nach und nach vollzieht sich die Agglutination in allen Tuben dieser zweiten Serie und wir sehen, dass sich in allen, je nach der in dem Gemische enthaltenen Salzmenge, ein mehr oder minder beträchtlicher Bodensatz bildet. In den Tuben der ersten Serie sehen wir gleichfalls Flocken und Niederschläge sich bilden, doch geschieht dies viel langsamer und sie setzen sich

weniger rasch ab. In den Tuben dieser Serie, welche 1 und 2^{mgrm} NaCl enthalten, zeigt sich nichts, selbst wenn die Niederschläge in den entsprechenden Tuben der anderen Serie sich bereits vollständig abgesetzt haben, und erst nach einigen Stunden sieht man darin einen leichten Bodensatz sich bilden.

Es werden demnach Mikroben, welche Zeit hatten, sich während einiger Stunden mit Agglutinin zu verbinden, und welche thatsächlich der Lösung alles Agglutinin entzogen haben, welche sie enthielt (was sich leicht nachweisen lässt, wenn man die Mischung auf Kerze filtrirt und der filtrirten Flüssigkeit NaCl und eine Cultur zusetzt), es werden, sagen wir, diese Mikroben, wenn man NaCl zusetzt, weniger rasch agglutiniert als jene, welche man erst mit NaCl geladen hat und denen man dann Serum zusetzt.

Durch dieses Experiment charakterisirt sich die chemische Natur des Phänomens noch besser. Wäre die Agglutination eine rein physikalische Erscheinung, so hätten wir sie ebenso rasch auch in den entsprechenden Tuben der beiden Serien erhalten müssen, da sie dieselben Dosen der gleichen Elemente enthalten. Wenn andererseits die Rolle der agglutinirenden Substanz darin besteht, die Bakterien in inerte Partikelchen zu verwandeln, wie man sagte, auf denen es sich fixirte, so hätten wir in der ersten Serie eine raschere Agglutination beobachten müssen, da die Bakterien während einer verhältnissmässig langen Zeit in Contact mit einer genügend concentrirten Lösung agglutinirender Substanz gestanden haben. Nun hat sich aber gerade das Gegentheil gezeigt.

Die „Theorie Physique“ von Bordet kann nach diesen Versuchen nicht mehr behauptet werden. Die Thatsache, dass die Agglutination nicht von der absoluten Quantität des Salzes, welches sich in der Mischung befindet, sondern von der Quantität abhängt, welche bereit ist, sich zu verbinden, kann auch noch durch den folgenden Versuch nachgewiesen werden, welcher gewissermaassen die Ergänzung zu dem vorangegangenen bildet.

Versuch K. Nehmen wir zwei Tuben, in welche wir eine gleiche Menge dialysirter Typhusemulsion; z. B. 2^{cem}, setzen. Fügen wir in Tubus I 7^{cem} destillirtes Wasser und 2^{mgrm} NaCl; in Tubus II 2^{mgrm} NaCl ohne Wasser bei. Diese Mischung lassen wir einige Zeit stehen. Es ist evident, dass die Bacillen des Tubus I nur eine geringere Quantität NaCl absorbiren können, als die Bacillen des Tubus II, weil die Lösung, in welcher sie schwimmen, bedeutend verdünnter ist. Andererseits wird, wenn wir die Flüssigkeit des Tubus II auf 9^{cem} erhöhen, so diese weniger reich an aufgelösten NaCl sein als diejenige des Tubus I, weil die darin befindlichen Bacillen mehr davon aufnehmen konnten.

Nach einiger Zeit Contact, setzen wir dem Tubus II 7^{cem} destillirtes Wasser und 1^{cem} verdünntes und dialysirtes Serum zu. Gleichzeitig fügen wir im Tubus I 1^{cem} Serum bei.

Wir sehen nun, dass sich die Agglutination im Tubus II sehr rasch, im Tubus I aber viel langsamer vollzieht.

Dieser Versuch zeigt uns deutlich, dass sich das NaCl nicht in der Lösung, sondern im Bacillenkörper selbst befinden muss. Wir haben in unseren beiden Tuben ganz genau gleiche Quantitäten derselben Elemente; doch sehen wir das Phänomen sich mit sehr veränderlicher Intensität vollziehen. Wir haben bereits gesehen, dass die agglutinirende Substanz sich augenblicklich auf der agglutinirbaren befestigt, jedoch dass diese Befestigung in Nichts die Bacillenleiber verändert, in denen sie sich vollzieht. Wenn zugleich die agglutinirende Substanz eine genügende Menge von Salz findet, um den unlöslichen Niederschlag zu bilden, so bildet sich dieser unmittelbar. Daher muss sich das Salz in den Mikrobenzellen selbst befinden; wenn es sich in der umgebenden Flüssigkeit aufgelöst findet, so muss, bevor die Erscheinung auftritt, eine gewisse Quantität in die mikrobische Zelle eingedrungen sein.

Wenn gleiche Mengen von Mikroben in ungleich concentrirten Lösungen suspendirt sind, so ist es augenscheinlich, dass jene, welche sich in der stärkeren Lösung befinden, mehr NaCl absorbiren werden. Und diese Mikroben befinden sich in den besten Vorbedingungen zur Agglutination, denn die Verbindung kann sich augenblicklich herstellen, ohne zu warten bis NaCl aus der umgebenden Flüssigkeit entnommen wird. Bei dem eben erwähnten Versuche vollzieht sich die Agglutination zunächst in der Mischung, welche am wenigsten NaCl in der umgebenden Flüssigkeit aufgelöst enthält (was sich zeigt, wenn man die beiden Flüssigkeiten auf sehr reine Filtrirkerze filtrirt und das Filtrat mit NO₃Ag-Lösung zersetzt).

Hier wirft sich eine interessante Frage auf: Ist es nöthig, dass die Flüssigkeit, in welcher sich die Agglutination vollzieht, gelöste Salze enthalte?

Wir können darauf antworten, dass es nicht nöthig sei, dass in die Flüssigkeit, in der die Mikroben sich agglutiniren, Salze aufgelöst sind, wenn nur die Mikrobenzellen solche enthalten.

Versuch L. In eine dichte Emulsion von salzfreien Typhusbacillen fügen wir eine kleine Quantität NaCl hinzu und setzen alles während einiger Zeit der gewöhnlichen Temperatur oder zu 37° aus. Hierauf centrifugiren wir kräftig, um so einen Bacillenniederschlag zu erhalten, der NaCl gebunden hat. Sobald der Niederschlag vorhanden ist, giessen wir die oben schwimmende Flüssigkeit ab und trocknen die Tube sorg-

fältig mit Filtrirpapier, um so gut als möglich jede Spur der salzigen Flüssigkeit zu entfernen. Wir haben sodann am Grunde der Tube den Bacillenniederschlag, der noch von einer so geringfügigen Menge salziger Flüssigkeit imprägnirt ist, dass wir dieselbe unbeachtet lassen können.

Der Niederschlag wird rasch in mit destillirtem Wasser verdünnter Serumlösung (soviel zur Agglutininirung nöthig erscheint) aufgeschwemmt. Man sieht nun die charakteristischen Flocken sich rasch bilden, obgleich die Flüssigkeit, in der sie sich zeigen, nur eine ganz untergeordnete Spur von NaCl enthält, welche ungenügend ist, die Erscheinung von sich selbst hervorzubringen.

Dieser Versuch ist überzeugend und entscheidend; doch muss er gut vorgenommen werden und er erfordert gewisse Vorsichtsmaassregeln. Es ist nöthig, dass die wässerige, selbstredend vollkommen salzfreie Serumlösung concentrirt genug sei, um eine rasche Agglutination herbeizuführen. Wenn dieselbe zu langsam ist, so wird sich eine gewisse, in den Bacillenzellen enthaltene Quantität NaCl in der umgebenden Flüssigkeit verlieren und der Versuch wird offenbar weniger präzise sein, besonders wenn man danach die Flüssigkeit untersuchen will, welche durch Filtration von dem erlangten Niederschlage abgenommen wurde.

Schlüsse.

Aus den in dem ersten Theile dieser Arbeit erwähnten Versuchen lassen die nachstehenden Schlussfolgerungen ableiten:

1. Wenn man die agglutinirende Serums substanz bei gänzlicher Abwesenheit von Salz auf die agglutininbare Substanz des Mikroben einwirken lässt, so vollzieht sich keine Agglutination.

2. Die Agglutination tritt immer auf, wenn drei Substanzen zusammen treten: die agglutinirende, die agglutininbare Substanz und das Salz.

3. Bei Abwesenheit des Salzes wird die agglutinirende Substanz schnell durch die agglutininbare Substanz des Mikroben gebunden. Diese Bindung alterirt die Vitalität der Bakterien in keiner Art.

4. Es besteht eine enge Wechselbeziehung zwischen den relativen Mengen der Substanzen, welche zur Hervorbringung des Phänomens der Agglutination zusammenwirken, und der erhaltenen Menge agglutininirter Substanz.

5. Das Salz spielt bei der Erscheinung der Agglutination eine active Rolle.

6. Dasselbe tritt in die Verbindung der agglutinirenden und agglutinirbare Substanz ein.

7. Die Agglutination kann auch in einer salzfreien Lösung eintreten, vorausgesetzt, dass die Bakterienzellen solches enthalten.

8. Die „Theorie Physique“ von Bordet wird also durch unsere Experimente als irrig erwiesen.

Brüssel, Januar 1901.
