

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Budapest.
Director: Prof. Leo Liebermann.)

Beitrag zur Frage der Hämagglutinine.

Von

Dr. **A. Bexheft.**

Die Frage, ob wir es bei der Agglutination mit der Wirkung bestimmter chemischer Substanzen (der „Agglutinine“) zu thun haben, ist noch nicht entschieden, wenn auch so manche Versuche für die Annahme solcher sprechen.

Solange die Reindarstellung dieser Substanzen nicht gelingt, muss, wenn wir die Agglutinine als chemische Individuen anerkennen wollen, zum Mindesten erwiesen werden, dass die Wirkung an bestimmte quantitative Verhältnisse zwischen agglutinirender Flüssigkeit und agglutininbarem Substrat gebunden ist.

Obzwar schon Gruber ein bestimmtes Verhältniss zwischen den auf einander einwirkenden Substanzen constatirte, indem er sich in seinen 1896 erschienenen ersten grundlegenden Arbeiten¹⁾, wie folgt, ausspricht: „Die Glabrificine (später von Gruber selbst in Agglutinine umgetauft) werden bei dieser Einwirkung auf die Bakterien verbraucht (gebunden, zersetzt?). Daher ist die Wirkung der Immunsäfte genau der angewandten Menge proportionell“, hatten die Forscher wie Förster²⁾, Winterberg³⁾, Nolf⁴⁾, Joos⁵⁾

1) Gruber, Ueber active und passive Immunität gegen Cholera und Typhus. Wiener klin. Wochenschr. 1896 Nr. 11 und 12. — Gruber, Theorie der activen und passiven Immunität gegen Cholera, Typhus und verwandte Krankheitsprocesse. Münchener med. Wochenschr. 1898 Nr. 9. — Gruber, Umtaufe. Wiener klin. Wochenschr. 1896 Nr. 13.

2) Förster, Quantitative Untersuchungen über die agglutinirende und baktericide Wirkung des Blutserums. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 24. 1897.

3) Winterberg, Untersuchungen über das Typhusagglutinin und die agglutininbare Substanz der Typhusbacillen. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 32. 1899.

4) Nolf, Contribution à l'étude des sérums antihématiques. Annales de l'Institut Pasteur 1900.

5) Joos, Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 36. 1901 und Zeitschr. f. Hyg. Bd. 40. 1902.

u. A. die quantitativten Verhältnisse bei der Agglutination in unzulänglicher Weise berücksichtigt. Dies bewog Eisenberg und Volk¹⁾ dazu, die Frage der quantitativen Verhältnisse einem eingehenden Studium zu unterwerfen.

In neuester Zeit hat Arrhenius²⁾ durch Berechnung der Eisenberg-Volk'schen Angaben eine mathematische Gesetzmässigkeit zwischen der Menge der Agglutinine und der agglutinirbaren Substanz ermittelt, welche sich durch folgende Formel ausdrücken lässt: $C = \text{const. } B^{2/3}$, wobei C die Menge des gebundenen, B die des frei gebliebenen Agglutinins bedeutet, während „const.“ eine jedem Serum eigenthümliche Constante ist.

Eisenberg und Volk hatten, wie auch die übrigen Forscher zum grössten Theil, ihre diesbezüglichen Versuche mit verschiedenen „Immunseris“ (richtiger vielleicht: auf künstlichem Wege agglutinirend gemachtes Serum) und den entsprechenden Bakterienaufschwemmungen, seltener mit Blutkörperchen, angestellt, während wir mit normalen Seris und roten Blutkörperchen angestellten diesbezüglichen Versuchen, ausser bei Landsteiner und Jagič (siehe weiter unten), nicht begnügen.

Ebenso spärlich finden wir in der Literatur Angaben über Versuche, die Agglutinine agglutinierten Massen wieder zu entziehen.

Hahn und Tromsdorff³⁾ gelang die Abspaltung der Agglutinine von agglutinierten Bakterienmassen durch sehr schwache ($1/100$ normale) Lösungen von NaOH sowie von Schwefelsäure; eine Kochsalzlösung jedoch blieb ohne Wirkung, was auf eine chemische Bindung zwischen Agglutinin und agglutinirbarer Substanz schliessen lässt. Landsteiner⁴⁾ und Jagič⁵⁾ konnten hingegen durch eine physiologische Kochsalzlösung den agglutinierten Blutkörperchen die gebundenen Hämagglutinine wieder entziehen; ein Befund, der wieder nicht eben für eine chemische Verbindung sprechen würde.

1) Eisenberg und Volk, Untersuchungen über die Agglutination. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 40. 1902. (Reiche Literaturangaben!)

2) Arrhenius, Zur physikalischen Chemie der Agglutinine. Zeitschr. f. physikal. Chemie Bd. 36. 1903.

3) Hahn und Tromsdorff, Ueber Agglutinine. Münchener med. Wochenschr. 1900 Nr. 19.

4) Landsteiner, Ueber Serumagglutinine. Münchener med. Wochenschr. 1902 Nr. 46.

5) Landsteiner und Jagič, Ueber die Verbindungen und die Entstehung von Immunkörpern. Münchener med. Wochenschr. 1903 Nr. 18.

Ich habe nun im Auftrage meines hochverehrten Chefs Herrn Prof. Liebermann zunächst die Frage zu beantworten versucht, ob sich einer agglutinirenden Flüssigkeit durch ein agglutininbares Substrat die wirksame Substanz völlig entziehen lässt oder nicht?

Als agglutinirende Flüssigkeit verwendete ich das nicht vorbehandelte, normale Serum des Rindes (also kein „Immunserum“!), welches Schweineblut agglutinirende Substanzen — Hämagglutinine — enthält.

Das Serum wurde aus frischem, von der öffentlichen Schlachthütte erhaltenem, defibrinirtem Rinderblut durch Centrifugiren dargestellt. Das Schweineblut, auch von der Schlachthütte erhalten, wurde defibrinirt und im Verhältnis von 1 zu 9 mit einer 0,9 %igen Kochsalzlösung, welche sich als mit dem verwendeten Serum und Schweineblutplasma isotonisch erwies, verdünnt.

Bei meinen Versuchen verfuhr ich folgendermaassen:

Ich brachte stets gleiche Mengen Serums (und zwar immer je 20 Tropfen) mit verschiedenen Mengen (und zwar 1—50 Tropfen) der oben beschriebenen 10 %igen Blutaufschwemmung zusammen, und zwar bei Zimmertemperatur und zugleich bei 37° C. im Thermostaten, schüttelte das Gemisch zuerst stark um und beobachtete nachher, ob eine Agglutination eintritt. Da die möglichst vollständige Agglutination nicht sehr rasch zustandekommt, beobachtete ich sie nach Ablauf von 1½ Stunden. Bei längerem (3- bis 4stündigem) Stehen nahm die Agglutination nicht mehr zu.

Ich muss gleich hier bemerken, dass die Agglutination niemals so vollständig war, dass sämtliche Blutkörperchen zu einem oder einigen grossen Haufen verklebt gewesen wären. Grössere Gruppen, aus 50—100 und mehr Blutkörperchen bestehend, konnten ziemlich selten beobachtet werden, so dass ich schliesslich gezwungen war, als ausgesprochen positive (+) Reaction schon eine Agglutination anzunehmen, bei welcher Gruppen von mindestens fünf Blutkörperchen vorhanden waren. Ich musste dabei sogar von einzelnen nicht agglutininnten, isolirt liegenden Blutkörperchen absehen, da solche in mehr oder minder grosser Anzahl stets zu sehen waren.

Als schwache (±) Agglutination betrachtete ich jene Fälle, wo die einzelnen Gruppen weniger als fünf Blutkörperchen zählten.

Bei fehlender (—) Agglutination fehlte jede Gruppierung, jede Verklebung.

Es musste allerdings vorher erst bewiesen werden, dass jene Verklebung der Blutkörperchen, welche ich als + oder \pm Agglutination bezeichnete, eine wirkliche, infolge der Serumzugabe eingetretene und vom Serum bedingte Agglutination sei und nicht ein vom Serum unabhängiges einfaches Zusammentreten der betreffenden Zellen. Dies war mir nämlich anfangs eben wegen der manchmal grossen Anzahl der isolirt stehenden Blutkörperchen zweifelhaft.

Dies zu unterscheiden, war einfach, da die ohne Serumzugabe derselben Behandlung unterworfenen Controlproben der Schweineblutaufschwemmung im Gegensatze zur wirklichen Agglutination immer ein völlig negatives Resultat ergaben, wobei kein einziges Mal das Zusammenkleben selbst nur zweier Blutkörperchen zu beobachten war. Ich glaubte daher berechtigt zu sein, die von mir als + oder \pm bezeichneten Fälle als wirkliche Agglutination aufzufassen.

Die Agglutination wurde nicht bloss mikroskopisch, sondern auch makroskopisch beobachtet. Wo nämlich Agglutination auftrat, dort senkten sich die Blutkörperchen nach $1\frac{1}{2}$ stündigem Stehenlassen dem Grade der Agglutination (welche durch die Grösse der einzelnen Gruppen bestimmt werden kann) proportional viel rascher und in compacteren Massen zu Boden, während dies bei den nicht agglutinierten Proben eine bedeutend längere Zeit in Anspruch nahm.

Es traten diese Unterschiede des makroskopischen Verhaltens in weit grösserem Maasse hervor, wenn ich die Proben nach $1\frac{1}{2}$ stündigem Stehenlassen drei Minuten lang centrifugirte.

Bei + Agglutination senkten sich die Blutkörperchen vollständig und in compacten Massen zu Boden, und war auch diese agglutinierte Masse, welche übrigens auch ein ziemlich geringes Volum einnahm, gegen die darüberstehende vollständig klare Flüssigkeit scharf abgegrenzt. Wenn ich nachher durch heftiges Umschütteln die agglutinierten Massen wieder zu trennen versuchte, gelang es mir niemals; denn die einzelnen Gruppen waren, mikroskopisch beobachtet, nie kleiner geworden.

Die Zerkleinerung durch starkes Schütteln gelang auch in den \pm Fällen nicht, wo die Abgrenzung der agglutinierten Masse gegen die darüberstehende klare Flüssigkeit nicht mehr ganz scharf war.

In den Fällen, wo keine Agglutination mikroskopisch zu erkennen war, hatte die beim Centrifugiren gebildete Blutkörperchen-

masse immer ein bedeutend grösseres Volum als in jenen Proben, wo die übrigens gleiche Blutmenge agglutiniert war. Die ganze Flüssigkeit blieb mit Ausnahme einer sehr geringen, hellen, oberen Schicht ganz trüb, und diese Trübung nahm nach unten allmählich zu, um dann ohne wahrnehmbare Grenzen in die Schicht der sich zu Boden gesetzten Blutkörperchen zu übergehen. Durch ein nicht allzu starkes Schütteln wurden die Blutkörperchen sehr leicht wieder vertheilt, so dass eine Verklebung auch von nur zwei Blutkörperchen niemals zu beobachten war.

Nachdem die Agglutination makro- und mikroskopisch untersucht wurde, musste noch die von der centrifugierten Blutkörperchenmasse vorsichtig abgegossene klare Flüssigkeit auf eventuell zurückgebliebene, nicht verbrauchte Agglutinine untersucht werden. $1\frac{1}{2}$ Stunden nach der neuerlichen Zugabe von zwei Tropfen Blutaufschwemmung zu diesem Abguss wurde mikro- und makroskopisch festgestellt, ob eine Agglutination eingetreten war oder nicht.

Die diesbezüglichen Versuche ergaben folgendes Resultat:

I. Versuch. 20 Tropfen Serum wurden immer in je 2 Reagensgläsern mit je 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 15 Tropfen Blutaufschwemmung unter starkem Schütteln gut vermischt, dann $1\frac{1}{2}$ Stunden lang stehen gelassen. Zugleich wurden 40 Tropfen der Blutaufschwemmung ohne jede Serumzugabe zur Controle derselben Behandlung unterworfen.

Tabelle I.

Bezeichnung	a	b	c	d	e	f	g	h	Controleprobe
Gemisch { Serum	20	20	20	20	20	20	20	20	—
v. Tropfen { Blutaufschwemmung	1	2	4	6	8	10	12	15	40
Agglutination nach $1\frac{1}{2}$ St.	++	++	++	++	++	+	+	+	—
Agglutination von 2 Tropfen Blutaufschwemmung durch den Abguss, nach weiteren $1\frac{1}{2}$ Stunden .	++	++	+	+	+	+	+	+	—

Agglutination in sämtlichen Reagensgläsern +. Die agglutinierten Gruppen bestehen in den Fällen a—e aus sehr viel Individuen (++), im Falle b aus den wenigsten. Controlblut: völlig negativ.

Der Abguss besitzt noch immer starke Agglutinationsfähigkeit.

II. Versuch. Da nun aus dieser Versuchsreihe ersichtlich war, dass die 15 Tropfen der Blutaufschwemmung zur Bindung sämt-

licher Agglutinine von 20 Tropfen Serum nicht genügten, verwendete ich in einer zweiten Versuchsreihe 5—50 Tropfen Blutaufschwemmung, um zu ermitteln, wo die Grenze der Agglutinationsfähigkeit des Serums liegt.

Tabelle II.

Bezeichnung	j	k	l	m	n	o	p	r	s	t	Controle- probe
Gemisch { Serum	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	—
v. Tropfen { Blutaufschwem- mung	5	8	10	15	20	25	30	35	40	50	50
Agglutination	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Agglutination von 2 Tropfen Blutaufschwemmung durch den Abguss	+	+	+	+	+	+	±	±	—	—	—

Wie ersichtlich, trat in jedem Falle Agglutination ein. Während aber der Abguss in den Fällen j—o agglutinirende Fähigkeit und in den Fällen p und r diese, wenn auch in geringerem Maasse, besass, konnte er in den Fällen s und t die von Neuem zugesetzten Blutkörperchen nicht mehr agglutiniren. Es genügten also schon 40 Tropfen der Blutaufschwemmung, um die ganze Menge der in 20 Tropfen Serum enthaltenen Agglutinine zu binden, zu „verbrauchen“.

III.—V. Versuch. Diese Versuchsreihen wurden zur Controle auf dieselbe Art und Weise ausgeführt (mit 5—50 Tropfen Blutverdünnung). Die Ergebnisse waren ganz dieselben wie in dem II. Versuch, so dass eine tabellarische Zusammenstellung der Resultate überflüssig erscheint. Nur im III. Versuch trat ein kleiner Unterschied zu Tage, wo nämlich in den Fällen s und t die Agglutination \pm war.

Es fiel bei allen Versuchen die Thatsache auf, dass die Agglutination nicht in allen Fällen die gleiche Intensität zeigte. Auf je mehr Blutkörperchen sich die Agglutinine vertheilen mussten, desto unvollständiger fiel auch die Agglutination aus. Die Zahl der isolirt stehenden Blutkörperchen wurde immer grösser; die einzelnen agglutinierten Gruppen hingegen umfassten immer weniger Individuen.

Es drängte sich unter solchen Umständen die Frage auf, ob bei dieser Erscheinung nicht vielleicht die Verdünnung der Agglutinine, hervorgerufen durch die dem Schweineblut beigegebene ver-

hältnissmässig grosse Menge Kochsalzlösung, eine Rolle spielt. (In den 20, 30, 40 und 50 Tropfen Blutaufschwemmung sind nämlich neben 2, 3, 4 und 5 Tropfen Blut 18, 27, 36 und 45 Tropfen der Kochsalzlösung enthalten.) Ich stellte nun parallele Versuche an, welche von den früheren nur insofern abwichen, dass anstatt 20—50 Tropfen Blutaufschwemmung, 2—5 Tropfen des unverdünnten Blutes dem Serum beigegeben wurden. Da nun aber selbst bei dieser Anordnung der Versuche die beobachteten Agglutinationserscheinungen sich mit den früheren ganz vollständig deckten, — muss die Abnahme der Agglutinationsintensität daraus erklärt werden, dass die Menge der Agglutinine sich auf eine grössere Anzahl von Blutkörperchenindividuen vertheilte, wobei die Wirkung auf die einzelnen Individuen an Intensität einbüsste.

Es ist also in den beschriebenen Versuchen in der That gelungen, dem Serum alle, Schweineblutkörperchen agglutinirenden Substanzen zu entziehen.

Eine fernere Frage war die, ob die agglutinirende Substanz den bereits agglutinierten Blutkörperchen durch ein indifferentes Lösungsmittel, nämlich physiologische (0,9 %) Kochsalzlösung, wieder entzogen werden kann?

Um dies zu entscheiden, benutzte ich die bei den oben beschriebenen Versuchen nach dem Abguss der darüber stehenden Flüssigkeit zurückgebliebenen agglutinierten Massen, aber nur in jenen Fällen, wo der Abguss keine Agglutinationsfähigkeit besass wo ich daher annehmen durfte, dass die ganze Menge der Agglutinine mit den Blutkörperchen in Verbindung getreten war (Fälle s und t).

Auch verwendete ich eigens zu diesem Zwecke nach demselben Verhältniss dargestellte grössere agglutinierte Massen, nachdem ich mich in jedem einzelnen Falle vorher überzeugete, dass die abgegossene Flüssigkeit keine freien Agglutinine mehr enthielt.

Diese agglutinierten Massen wurden verschieden lang (von einer halben bis zu 14 Stunden) mit physiologischer Kochsalzlösung digerirt und durch Hinzufügen von 2 Tropfen Blutaufschwemmung der Abguss auf Agglutinationsfähigkeit geprüft, um zu sehen, ob darin wieder in Lösung gebrachte Agglutinine nachweisbar sind oder nicht.

Die Ergebnisse dieser Versuche kann ich sehr kurz zusammenfassen. In keinem einzigen Falle konnte ich, weder bei Zimmertemperatur noch bei 37 ° C. im Thermostaten, einmal gebundene Agglutinine den agglutinierten Massen entziehen.

Die Resultate meiner Versuche sind die folgenden:

1. Dem normalen Rinderserum können durch entsprechende Mengen Schweineblut sämtliche, schweineblutkörperchen-agglutinirende Substanzen entzogen werden.

2. Zum Entziehen dieser Hämagglutinine des Rinderserums war in meinen Versuchen immer die nämliche Menge Schweineblut nothwendig.

3. Den agglutinierten Schweineblutkörperchen konnten durch physiologische Kochsalzlösung keine Hämagglutinine entzogen werden, welche imstande gewesen wären, Schweineblutkörperchen abermals zu agglutinieren.

Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, dass im Rinderblutserum thatsächlich eine eigene Substanz vorhanden ist, welche die Agglutination der Schweineblutkörperchen bewirkt; ferner, dass man es hier wahrscheinlich mit einer chemischen Bindung dieser Substanz zu thun hat, da sie durch einfache Lösungsmittel (physiologische Kochsalzlösung) nicht wiederzugewinnen ist.
