

(Aus der bakteriol. Abteilung des Reichs-Gesundheitsamtes [Direktor: Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Haendel; Laborat.-Vorst.: Oberreg.-Rat Prof. Dr. L. Lange].)

Untersuchungen über den Agglutinationsvorgang unter Verwertung des Agglutinationsoptimums.

Der Einfluß der Kochsalzverdünnung auf die Antikörper der Sera.

Von

Dr. med. Georg Heuer.

Die bekannte Beobachtung, daß bei Verdünnungsreihen agglutinierender Sera bei hohen Serumkonzentrationen die Agglutination weniger ausgebildet ist als bei stärkeren Verdünnungen, daß mit anderen Worten ein Agglutinationsoptimum in die Erscheinung tritt, hat zu mannigfachen Erklärungsversuchen Anlaß gegeben, auf die am Schluß meiner Arbeit näher einzugehen sein wird. Hier sei nur in Kürze erwähnt, daß diese schon von Eisenberg und Volk, Wassermann u. a. beobachtete Erscheinung zunächst auf bestimmte den Agglutinen nahe verwandte Antikörper, die sog. Agglutinoide zurückgeführt wurde, während später namentlich von Porges der Vorgang auf rein kolloid-chemischem Wege ohne Zuhilfenahme dieser der Ehrlichschen Seitenkettentheorie entsprungenen spezifischen Körper zu erklären versucht wurde.

Auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Ludwig Lange wurden die folgenden Versuche angestellt, die an die Frage des Agglutinationsoptimums von einem anderen Gedankengang ausgehend herantreten. Nimmt man für die Agglutinine neben ihrem die Hauptsache ausmachenden eiweißartigen Komplex auch eine lipoide Komponente an, welcher bei der Einwirkung auf die Bakterienmembran — die Agglutination ist eine Membranreaktion — die verknüpfende Rolle zugesprochen werden könnte, so trat der Gedanke auf, es könnten bei der Agglutination Vorgänge mitspielen, wie sie für Lipoide in dem Meyer-Overtonschen Verteilungsgesetz zum Ausdruck kommen. Es sei gleich hier ausdrücklich hervorgehoben, daß es sich, da ja die Agglutinine bestimmt keine reinen Lipoide sind, nur um annähernd ähnliche Vorgänge handeln kann.

Bei meinen Versuchen wurde also von folgender, zunächst noch ganz allgemein gefaßter Arbeitshypothese ausgegangen:

Die Agglutinine haben zum lipoidhaltigen Serum eine gewisse Affinität, die um so geringer wird, je mehr das Serum mit Koch-

salzlösung verdünnt wird; um so mehr treten sie dann an die Bakterien über. Dieser Übertritt an die Bakterien muß mehr oder weniger gehemmt oder behindert werden, wenn als Verdünnungsmittel statt der physiologischen Kochsalzlösung normales Serum genommen wird.

Als agglutinierende Sera wurden vom Esel gewonnene Sera gegen Typhus, Paratyphus B, Flexner und Y verwendet. Als Verdünnungsmedien der spezifisch agglutinierenden Sera wurden benutzt: Physiologische Kochsalzlösung, verschiedene durch Carbolzusatz konservierte Normaltiersera, unverdünnt und mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10 und 1 : 100 verdünnt. Als agglutinable Substanz wurden die gut agglutinablen Stämme „Typhus Renken“, Paratyphus B „Hellwig“, „Flexner“ und „Y“ genommen. Die Verdünnungen wurden in der üblichen Weise in Reagensröhrchen von je 1 ccm angesetzt; dann wurden die zur Agglutination verwendeten Bakterien unmittelbar vom Nährboden weg in Aufschwemmung in dem jeweils in der zugehörigen Reihe angewendeten Verdünnungsmedium — nach einer Testaufschwemmung in optisch gleicher Dichte hergestellt — in Mengen von je 0,1 ccm hinzugefügt.

Zur Kontrolle dienten in sämtlichen Versuchen die jeweils verwendeten Verdünnungsmedien mit Zusatz der im Versuch zur Agglutination gebotenen Kultur. Die Resultate wurden mit Hilfe des Agglutinoskops nach 60 Minuten bei 37° und 20 Stunden bei Zimmertemperatur abgelesen.

Bei der Verwendung von Normaltierseren als Verdünnungsmedien mußte zunächst selbstverständlich der störende Einfluß der Normalagglutinine der Seren ausgeschaltet werden. Es wurden daher Vorversuche angestellt, um eine Entfernung der Normalagglutinine zu erzielen, die das Versuchsergebnis trüben konnten. Dieser Zweck wurde auf verschiedene Weise zu erreichen versucht, anfänglich jedoch ohne befriedigenden Erfolg.

Zunächst wurde Normal-Eselserum im Wasserbade 30' einer Temperatur von 55° ausgesetzt, und zwar unverdünnt und in den Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10 und 1 : 100. Die drei so vorbehandelten Verdünnungsmedien wurden auf unspezifische Agglutination gegen Typhusbacillen austitriert („Vorversuch“). In den höheren Konzentrationen des unverdünnt erwärmten Normal-Eselserums trat eine schwache, spurweise Agglutination auf.

Eine Beeinflussung der Agglutination von Typhus-Eselserum gegen Typhusbacillen war demnach in der Reihe anzunehmen, in der unverdünntes Normal-Eselserum als Verdünnungsmedium angewendet wurde. In den üblichen Verdünnungsreihen — spezifisches Serum fallend verdünnt mit dem jeweils verwendeten Verdünnungsmedium

Spezifisches Serum	Stamm	Verdünnungsmedium	1:10	1:20	1:40	1:80	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	Kontrolle
Typhus-Eselserum	Typh. „Ronken“	NaCl-Lösung	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	— Sp
„	„	Normal-Eselserum un-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	— Sp
„	„	verdünnt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	— Sp
„	„	Normal-Eselserum 1:10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	— Sp
„	„	1:100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sp	— Sp

— wurde der Agglutinationstiter von Typhus-Eselserum gegen Typhusbacillen und die Lage des Agglutinationsoptimums bestimmt („Hauptversuch“).

Das Agglutinationsoptimum wurde durch vergleichende Auswertung der bei den verschiedenen Konzentrationen des spez. Serums auftretenden Agglutination gewonnen. Es wurden folgende Agglutinationsgrade gewertet:

1. Große Bakterienhaufen abgesetzt, Flüssigkeit völlig klar (+++).

2. Bakterienhaufen kleiner, Flüssigkeit klar (++).

3. Feine Bakterienhaufen, Flüssigkeit fast klar(+).

4. In bakterientrüber Flüssigkeit kleine Bakterienhäufchen (Sp.).

5. Flüssigkeit durch Bakterien homogen getrübt. (—)

In der Reihe, in der physiologische Kochsalzlösung als Verdünnungsmedium verwendet wurde, lag das Optimum der Agglutination bei der Serumkonzentration 1 : 100 und 1 : 200. Wurde unverdünntes Normal-Eselserum als Verdünnungsmedium benutzt, war das Optimum bei der Serumkonzentration 1 : 10. Bei Verwendung von Normal-Eselserum mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10 bzw. 1 : 100 verdünnt trat die optimale Agglutination bei den Serumkonzentrationen 1 : 40 bis 1 : 200 bzw. 1 : 80 bis 1 : 400 auf (s. Tabelle).

In den Reihen, in denen Normal-Eselserum als Verdünnungsmedium unverdünnt und 1 : 10 bzw. 1 : 100 verdünnt genommen ist, ist also eine Verschiebung des Optimums in die höheren Konzentrationen eingetreten. Diese Verschiebung der Lage des Optimums geht in der Reihe mit dem Verdünnungsmedium: Normal-Eselserum 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wieder zurück; das Optimum nähert sich wieder der Lage in der Reihe mit dem Verdünnungsmedium: physiologische Kochsalzlösung und deckt sich teilweise mit ihr, um in der Reihe mit dem Verdünnungsmedium: Normal-Eselserum 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt ganz mit ihr übereinzustimmen, dabei aber in die höheren wie auch niederen Konzentrationen verbreitert zu sein.

Ein weiterer Versuch ergab, daß auch eine Erwärmung des Normal-Eselserums in der gleichen Weise auf 60 ° die Normalagglutinine nicht völlig ausschaltete, wie die Prüfung auf unspezifische Agglutination zeigte.

Der Einfluß der Erwärmung auf die Lage des Agglutinationsoptimums und die Frage, ob die Erwärmung überhaupt eine Schädigung der Normalagglutinine hervorruft, wurde an Vergleichsreihen geprüft.

Es ergab sich hierbei, daß die unspezifische Agglutination des erwärmten Normal-Eselserums gegen Typhusbacillen sich von derjenigen des nicht erwärmten Serums deutlich unterschied: Während das erwärmte Normal-Eselserum nur in den höchsten Konzentrationen (bis 2,5 Su : 1 NaCl) eine spurweise Agglutination erkennen ließ, trat im unerwärmten Normal-Eselserum eine positive Agglutination bis 1 : 100 ein. Die Lage des Optimums im „Hauptversuch“ wurde durch den Erwärmungsprozeß nicht beeinflusst.

Auch bei Verwendung unvorbehandelten Normal-Eselserums trat das Agglutinationsoptimum scharf zutage. Das Agglutinationsoptimum lag in der Reihe: Verdünnungsmedium physiologische Kochsalzlösung bei den Serumkonzentrationen 1 : 80, 1 : 100 und 1 : 200. In der Reihe: Verdünnungsmedium unverdünntes Normal-Eselserum, sowohl erwärmt wie nicht erwärmt, trat die Linksverschiebung des Agglutinationsoptimums in die Konzentrationen 1 : 10 und 1 : 20 ein. Bei Verwendung der Verdünnungsmedien Normal-Eselserum 1 : 10 bzw. 1 : 100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt rückte das Optimum wieder nach rechts in beiden Vergleichsreihen in die Konzentrationen 1 : 40 und 1 : 80 bzw. 1 : 80, 1 : 100 und 1 : 200. Bei Verwendung von Kaninchen-serum in der gleichen Weise trat die gleiche Erscheinung der Linksverschiebung und des Nach-rechts-Rückens des Agglutinationsoptimums ein.

Eine Ausschaltung der Normalagglutinine durch Zusatz von Kieselgur mit nachfolgendem Zentrifugieren führte ebensowenig zum Ziele wie eine Behandlung mit *Prodigosus* bacillen. Die *Prodigosus* bacillen wurden mit Kochsalzlösung vom Nährboden abgeschwemmt, auszentrifugiert und dem Normalserum zugesetzt. Die nach 60' bei 37 ° agglutinierten *Prodigosus* bacillen wurden dann in der elektrischen Zentrifuge ausgeschleudert, so daß das überstehende Normalserum völlig geklärt verwendet werden konnte. Das Agglutinationsoptimum hatte die gleiche Lage wie in den früheren Versuchen.

Erst eine Abbindung der Normalagglutinine durch die gleichen Bakterien, die auch im Hauptversuch zur spezifischen Agglutination verwendet wurden, führte zu ihrer völligen Ausschaltung. Die Bakterien wurden mit dem jeweils verwendeten Normalserum vom Nährboden abge-

schwemmt. Nach 60' bei 37° im Brutschrank war die Abbindung der Normalagglutinine durch Agglutination eingetreten. Die durch Zentrifugieren geklärten Normalseren vermochten keine unspezifische Agglutination gegen dieselbe Art von Bakterien, mit der abgesättigt war, mehr hervorzurufen. Die unspezifische Agglutination so vorbehandelten sowohl aktiven wie inaktivierten Normal-Eselserums war in sämtlichen Konzentrationen negativ. Die Lage des Agglutinationsoptimums bei der spezifischen Agglutination von Typhus-Eselserum gegen Typhusbacillen war die typische.

Durch Absättigung der Normalsera mit Paratyphus-B-Bacillen gelang es sowohl die Normalagglutinine gegen Paratyphus-B-Bacillen wie auch gegen Typhusbacillen auszuschalten. Ebenso wurden die Normalagglutinine gegen Paratyphus-B-Bacillen durch Absättigung mit Typhusbacillen ausgeschaltet. In der gleichen Weise gelang eine „homologe“ wie auch „heterologe“¹⁾ Absättigung der Normalagglutinine mit den Pseudo-Ruhrbacillen „Flexner“ und „Y“ gegen „Flexner“- „Y“- und Typhusbacillen.

Die Lage des Optimums der Agglutination war in allen Versuchen die typische, genau präzisierbar durch den qualitativen Grad der Agglutination. Auch ein Versuch, an Stelle spezifischen Serums nicht vorbehandeltes Normal-Eselserum zur Agglutination von „Y“-Bacillen in mit „Y“-Bacillen abgesättigtem Normal-Eselserum und in physiologischer Kochsalzlösung zu verwenden, zeigte deutlich, daß die Lage des Agglutinationsoptimums durch das Verdünnungsmedium bestimmt wird.

In den Versuchen, in denen es nicht gelungen war, die Normalagglutinine völlig auszuschalten, war keine Bestimmung des Endtiters des jeweiligen spezifischen Serums möglich. Bei völliger Ausschaltung der Normalagglutinine zeigte sich, daß der bei Verdünnung mit Normalserum erhaltene Titer des verwendeten spezifischen Serums beträchtlich herabgesetzt war. Für Typhus lag er bei der Verdünnung mit abgesättigtem, unverdünntem Normalserum fast konstant bei 1 : 400, für Y bei 1 : 200 und bei Paratyphus B bei 1 : 800 bis 1 : 400. Mit steigendem Gehalt an Kochsalzlösung in dem Normalserum stieg der Titer des spezifischen Serums, um bei Verwendung physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsmedium seinen höchsten Wert zu erreichen.

Ein weiterer Versuch zeigte, daß die zur Agglutination verwendeten Bakterien durch Erwärmung von 30' im Wasserbade auf 60°, 80° und

¹⁾ Hier von einer „homologen“ und „heterologen“ Absättigung zu sprechen, dürfte nur unter Vorbehalt möglich sein, da die Frage der Spezifität der Normalagglutinine noch nicht entschieden ist, wenn man auch in neuerer Zeit immer mehr einer Spezifität zuneigt.

skopisch unvollkommene Agglutination (deutlich erkennbarer Niederschlag — Überstehendes leicht getrübt) hervorzurufen.

Nach Eintritt der Agglutination, also nach 26 Stunden, werden die Röhren zentrifugiert, und der Titer der überstehenden Flüssigkeit nach der gleichen Methode bestimmt. Darnach wird die absolute Adsorption und der Adsorptionskoeffizient berechnet. Die Auswertung der Restagglutinine erfolgte im jeweiligen zugehörigen Verdünnungsmedium unter Zugrundelegung des relativen Gesamtagglutininwertes im betreffenden Verdünnungsmedium. Die Lage des Optimums wurde nach 2 Stunden bei 37° im Agglutinoskop bestimmt (s. Tab. S. 105).

Die Lage des Optimums ist in beiden Reihen die typische. Der Endtiter des Ty-Eselserums in Kochsalzlösungsverdünnung beträgt 1 : 10 000 und in Verdünnung mit Normal-Eselserum 1 : 400.

Bestimmung des Titers des Überstehenden gegen Ty-Stamm „Renken“.

NaCl-Verdünnung des Überstehenden		1:2	1:4	1:5	1:8	1:10	1:20	1:40	1:50	1:80	1:100	1:200	Kontrolle
Reihe: Verdünnungsmedium NaCl-Lösung:													
1. Ausgangsverdünnung	1:10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
2. „	1:20	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
3. „	1:40	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
4. „	1:80	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. „	1:100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6. „	1:200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7. „	1:400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8. „	1:800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9. „	1:1000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10. „	1:5000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11. „	1:10 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Normal-Eselserum-Verdünnungen des Überstehenden		1:2	1:4	1:5	1:8	1:10	1:20	1:40	1:50	1:80	1:100	1:200	Kontrolle
Reihe: Verdünnungsmedium Normal-Eselserum:													
1. Ausgangsverdünnung	1:10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2. „	1:20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. „	1:40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4. „	1:80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. „	1:100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6. „	1:200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7. „	1:400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Die Betrachtung der quantitativen Bindungsverhältnisse (s. Tabellen S. 106 u. 107) hat also eine Aufklärung über die Erscheinung der „Linksverschiebung“ des Agglutinationsoptimums gegeben:

Das Agglutinationsoptimum liegt bei der Konzentration des spezifischen Serums, bei der $\frac{20}{20}$ der dargebotenen Agglutinine zuerst gebunden werden.

Berechnung der absoluten Adsorption und des Adsorptionskoeffizienten.

	Ausgangs- verdünnung	Dargebotene Agglutinationseinh.	Titer des Überstehenden	Absolute Adsorption	Adsorptions- koeffizient
Verdünnungs- medium: NaCl-Lösung	1: 10	1000	1: 100	900	18/20
	1: 20	500	1: 40	460	18 5/20
	1: 40	250	1: 10	240	19 2/20
	1: 80	125	1: 2	123	19,68/20
	1: 100	100	—	100	20/20
	1: 200	50	—	50	20/20
	1: 400	25	—	25	20/20
	1: 800	12,5	—	12,5	20/20
	1: 1000	10	—	10	20/20
	1: 5000	2	—	2	20/20
	1: 10 000	1	—	1	20/20
Verdünnungs- medium: Normal-Esel- serum	1: 10	40	—	40	20/20
	1: 20	20	—	20	20/20
	1: 40	10	—	10	20/20
	1: 80	5	—	5	20/20
	1: 100	4	—	4	20/20
	1: 200	2	—	2	20/20
	1: 400	1	—	1	20/20

Es war aber noch zu untersuchen, ob der Ausfall der Agglutination je nach dem Verdünnungsmedium nicht auch auf andere bestimmte Gründe chemisch-physikalischer Art zurückgeführt werden könne.

Zuerst wurde der Einfluß des für alle kolloidalen Reaktionen wichtigen Kochsalzgehaltes geprüft. Nach Bunge und Abderhalden beträgt der ziemlich konstante Gehalt an NaCl in den Seren der von ihnen untersuchten Tiere, wie Rind, Schwein, Kaninchen usw., rund 0,6%. Da nun der Gehalt an NaCl der physiologischen Kochsalzlösung gleich 0,85% ist, wurde der Einfluß des verschieden großen Kochsalzgehaltes der Verdünnungsmedien auf die Lage der Agglutinationsoptima geprüft. Durch NaCl-Zusatz wurden die Normalsera auf einen NaCl-Gehalt von 0,85% gebracht, und die Agglutination in diesem 0,85% kochsalzhaltigen Normalserum mit der in physiologischer Kochsalzlösung verglichen. Ebenso wurde ein Vergleich angestellt in 0,6proz. Kochsalzlösung, die zwar hypotonisch, aber an NaCl-Gehalt den Normalseren entspricht, und Normalserum. Ferner wurden als Verdünnungsmedien hypertonsche Kochsalzlösungen mit 1,45% NaCl-Gehalt und Normalsera mit Zusatz von 0,85% NaCl in Substanz verwendet. Die hier geprüften Kochsalzlösungen und Normalsera mit zwischen 0,6 bis 1,7% schwankendem Gehalt an NaCl zeigten keine Beeinflussung der Agglutination. Der Einfluß des Serums tritt auch trotz über doppeltem

NaCl-Gehalt in der bisherigen Weise in die Erscheinung. Bedingend sind also allein die Eiweißkörper der Sera.

Die Beziehung zwischen Agglutinationsoptimum und Reaktion wurde durch Prüfung der H-Ionenkonzentration nach Michaelis dahin entschieden, daß die H-Ionenkonzentration ersichtlich nur durch das Verdünnungsmedium bedingt wird. Beziehungen zur Lage des Optimums und zum Gesamttiter der jeweiligen Reihen bestehen, wie schon von vornherein zu erwarten war, nicht.

Spez. Serum	Verdünnungsmedium	pH bei den Konzentrationen des spez. Serums			
		1:10	1:40	1:100	1:1600
Typhus-Eselserum	NaCl-Lösung	7,3	7,3	7,3	7,3
„ „	Normal-Eselserum unverdünnt	7,8	7,8	7,8	7,8
„ „	„ „ 1:10	7,4	7,4	7,4	7,4

Es erschien dagegen nicht ausgeschlossen, daß die Oberflächenspannung von Belang für den Grad der Agglutination der Bakterien war.

Die in Betracht kommenden Systeme wurden mittels des Traubeschen Stalagmometers untersucht¹⁾. Eine Beziehung der Oberflächenspannung zur Lage des Agglutinationsoptimums war nicht festzustellen.

Spezifisches Serum	Verdünnungsmedium	Tropfenzahl für die Konzentration des spez. Serums			
		1:10	1:40	1:100	1:1600
Typhus-Eselserum	NaCl-Lösung	42,25	41,0	40,0	39,25
„ „	Normal-Eselserum unverdünnt	53,5	53,25	53,25	53,0
„ „	„ „ 1:10	44,5	43,25	43,0	42,75

Tropfenzahl für: Aqua dest. 40,25; 0,85proz. NaCl-Lösung 39,25; Typhus-Eselserum 53,25; Normal-Eselserum 53,5. — Die halbfetten Zahlen entsprechen den Röhrchen mit dem jeweiligen „Optimum“.

In den Serumreihen sind die Oberflächenspannungen überwiegend durch das Verdünnungsmedium mit seiner geringen Oberflächenspannung beeinflusst. Die durch den fallenden Gehalt an spezifischem, agglutinierendem Serum bedingte Zunahme der Oberflächenspannung ist weniger ausgeprägt. Die gewonnenen Werte sind genügend unterschiedlich, um mit Bestimmtheit sagen zu können, daß die Oberflächenspannung ohne gesetzmäßigen Einfluß auf den Grad der Bakterienausflockung ist.

¹⁾ Hierbei hat sich die von Gildemeister vorgeschlagene Reinigung des Apparates mit verdünnter Antiforminlösung vorzüglich bewährt, während sonst am gleichen Material übereinstimmende Befunde nicht zu erhalten waren.

Besprechung der Ergebnisse.

1. Die Versuche haben ergeben, daß bei den untersuchten Bakterienstämmen, die sich durch gute Agglutinabilität auszeichnen, nämlich Typhusstamm „Renken“, Paratyphus-B-Stamm „Hellwig“, Pseudoruhrstämme „Flexner“ und „Y“ stets ein Agglutinationsoptimum zu erkennen ist. Die Lage dieses Agglutinationsoptimums ist abhängig von den in den einzelnen Reihen verwendeten Verdünnungsmedien des spezifischen Serums. Wird als Verdünnungsmedium physiologische Kochsalzlösung verwendet, so zeigt sich bei den Konzentrationen 1 : 100 und 1 : 200 des spezifischen Serums ein Optimum der Agglutination. Bei Verwendung unverdünnter Normaltisersera als Verdünnungsmedien tritt ein Optimum der Agglutination bei den Konzentrationen 1 : 10 und 1 : 20 des spezifischen Serums auf. Werden mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10 bzw. 1 : 100 verdünnte Normalsera als Verdünnungsmedien verwendet, so befindet sich ein Agglutinationsoptimum bei den Konzentrationen 1 : 20, 1 : 40 und 1 : 80 bzw. 1 : 80, 1 : 100 und 1 : 200.

Diese „Linksverschiebung des Optimums“ bei Verwendung von Serum als Verdünnungsmedium und das allmähliche „Rechtsrücken“ mit dem steigenden Gehalt des Verdünnungsmediums an Kochsalzlösung hat sich als ein festes Gesetz erwiesen, da die Erscheinung bei jeder der verwendeten Arten von Normalserum (Esel, Kaninchen, Rinder, Schwein, Pferd) und spezifischem Serum, sowie von Bakterien (s. oben) und bei verschiedener Weise der Vorbehandlung der Normalsera und der Bakterien auftritt.

Aus diesem sozusagen „über den spezifischen Beziehungen stehenden“ Verhalten geht zwingend hervor, daß die Erscheinung auf unspezifische physikalisch-chemische Verhältnisse und Bedingungen zurückzuführen ist.

2. Die Untersuchungen haben ergeben, daß die Lage des Agglutinationsoptimums in den verschiedenen Verdünnungsmedien-Reihen nicht abhängt von dem durch die verschiedenen Verdünnungsmedien bedingten Gehalt an Kochsalz.

Eine Untersuchung der H-Ionenkonzentrationen nach Michaelis zeigte, daß die H-Ionenkonzentration ebenfalls keinen Einfluß auf die Lage des Agglutinationsoptimums hat. Die H-Ionenkonzentration bleibt innerhalb der einzelnen Reihen annähernd gleich; nur in Abhängigkeit von den verschiedenen angewandten Verdünnungsmedien tritt eine Änderung der H-Ionenkonzentration ein.

Auch die mit dem Traubeschen Stalagmometer bestimmten Oberflächenspannungswerte in den Reihen der verschiedenen Verdünnungsmedien lassen keinen Einfluß der Oberflächenspannung auf die Lage des Agglutinationsoptimums erkennen.

3. Diese negativen Ergebnisse führen dazu, die Ursache der anscheinend hemmenden, an sich schon bekannten, Wirkung des Normalserums in einer Zurückhaltung der Agglutinine zu suchen.

Einen Einblick in diese Zurückhaltung, namentlich in die quantitativen Verhältnisse derselben gaben uns die im quantitativen Bindungsversuch nach Eisenberg und Volk festgestellten Befunde.

Bisher hat man die Hemmung der Agglutination in hohen Serumkonzentrationen hauptsächlich bei spezifischem Serum näher untersucht. Zur Erklärung dieser dem sog. Neisser-Wechsberg'schen Phänomen nahe verwandten Erscheinung hat man ebenso wie für die hemmende Wirkung der Normalsera die Agglutinoide, auch Proagglutinoide und Synagglutinoide herangezogen (Eisenberg und Volk, v. Wassermann u. a.).

Meine Beobachtungen sind, wie unten (s. 5.) ausgeführt werden wird, mit der Annahme derartiger Körper gänzlich unvereinbar.

4. Durch die in den vorliegenden Versuchen meines Wissens zum erstenmal angewandte Technik, den in die Erscheinung tretenden Agglutiningehalt eines spezifischen Serums ohne jeden Zusatz von Kochsalzlösung auszutitrieren und im Vergleich mit dem auf die gebräuchliche Art ermittelten Gehalt zu setzen, sind wir zunächst instande, uns ein Bild über die Menge der zurückgehaltenen Agglutinine zu machen.

Um den Endtiter bei der neuen Versuchsanordnung genügend scharf und sicher bestimmen zu können, war es nötig, die als Verdünnungsmedien dienenden Sera durch eine Vorbehandlung von den Normalagglutininen völlig zu befreien.

Nachdem dies trotz anfänglicher Schwierigkeiten (s. o.) gelungen war, zeigte sich nun ohne Ausnahme und unabhängig von der angewandten Art der Sera und Bakterien, in allen Reihen mit unverdünntem Normalserum ein gegenüber der Kochsalzreihe beträchtlich herabgesetzter Titer, der für Typhus fast konstant bei 1:400, für Y bei 1:200 lag und bei Paratyphus B etwas schwankend war (1:800 bis 1:400), wobei ein gewisser Einfluß der Serumart in die Erscheinung trat.

Bei steigendem Verdünnungsgrad des Normalserums mit Kochsalzlösung (aber nicht von Kochsalz in Substanz) steigt auch der Titer an und erreicht bei Zusatz von 100 Kochsalzlösung zu 1 Serum meist den in der gebräuchlichen Weise ermittelten Titer der reinen „Kochsalzreihe“.

Bei der Untersuchung der quantitativen Bindungsverhältnisse von Agglutinin an die zur Agglutination gebotenen Bakterien ergab sich für die „Normalserumreihe“ ein Titer von 1:400 gegenüber einem Titer des gleichen spezifisch agglutinierenden Serums von 1:10 000 in der

Kochsalzreihe. Durch das Normalserum werden also 9600 von den in der Kochsalzreihe in die Erscheinung tretenden 10 000 Agglutinationseinheiten verdeckt.

5. Wie ist nun dieses Verdecken zu erklären?

Agglutinoide sind schon aus dem Grunde völlig auszuschließen, weil sie bei ihrer angenommenen erhöhten Avidität, bei der Vorbehandlung der Verdünnungssera herausgenommen sein müßten. Würde man die Agglutinoide aber in spezifischem Serum annehmen, so ist es widersinnig, sie in der Konzentration 1 : 10 der „unverdünnten Normalserumreihe“, wo ja stets ein Optimum der Agglutination beobachtet wurde, trotz ihrer größeren Menge durch das Verdünnungsserum ausschalten oder paralisieren zu lassen, wogegen sie in den folgenden Konzentrationen der gleichen Reihe bis zu 1 : 80 und 1 : 100, wo sie auch nach dem Ergebnis der Kochsalzreihe nicht mehr vorhanden sein sollen, in die Erscheinung treten und „hemmend“ wirken sollen.

Die ungezwungenste Erklärung für die Tatsache des scheinbaren Verschwindens der Agglutinine liegt in der Annahme einer Zurückhaltung, d. h. eines Festhaltens des Agglutinins und seiner Fernhaltung von den Bakterien.

Von Eisenberg und Volk ist für spezifisches Serum in der Kochsalzreihe in hohen Konzentrationen, beispielsweise bei Serumverdünnung 1 : 2, ein Adsorptionskoeffizient von nur $11/20$ festgestellt, der bei 1 : 100 $18/20$ betrug und erst bei 1 : 400 den Wert von $20/20$ erreichte. Bei meinem Versuch war bei 1 : 10 in der Kochsalzreihe der Adsorptionskoeffizient bereits $18/20$. Solche Unterschiede sind bei verschiedenen Seris und der verschiedenen Agglutinierbarkeit (Agglutininanziehung) der Bakterien ohne weiteres verständlich. Fest steht also, daß auch bei der Kochsalzverdünnung in den hohen Konzentrationen nicht alles Agglutinin an die Bakterien herangeht. Der Anteil, der in dem quantitativen Bindungsversuch zurückblieb, betrug 100 Agglutinationseinheiten.

Ich betrachte diesen Anteil nicht als Überschuß im strengen Wertsinn, sondern als zurückgehaltene Menge, weil erst auf Grund dieser Annahme die quantitativ so hochgradige Zurückhaltung im Normalserum (als Verdünnungsmedium) verständlich wird. Wir werden also aus den Befunden der Normalserumreihe indirekt zu einer Erklärung für die Kochsalzreihe geführt, ja sogar gezwungen.

Nun erhebt sich die Frage, wie man diese Zurückhaltung selbst erklären soll. Die kolloidchemische Auffassung der Immunitätsreaktionen, wie sie schon seit langem von Paltauf, Porges u. a. vertreten und neuerdings von Herzfeld und Klinger (Weichardts Ergebnisse 1920, S. 288) dargestellt ist, bietet ohne weiteres die Handhabe zu einer ungezwungenen Erklärung. Der von Prof. Lange an-

genommene Ausgangspunkt, der ja auch nur als Arbeitshypothese diente, nämlich eine Art Verteilungsgesetz wie für Lipide anzunehmen, muß in dieser speziellen Form wohl fallen gelassen werden, wenn auch der Anteil von Lipidkomplexen am Agglutinationsvorgang, zum mindesten bei einigen Bakterienarten (Milzbrand, Säurefeste), noch der weiteren Aufklärung harren. Im Grunde aber kommt rein äußerlich die Erscheinung des Zurückhaltens eines Teiles der Gesamt-agglutinine und des Überganges der Hauptmenge an die Bakterien doch auf eine Verteilung hinaus.

Das Zurückhalten von Agglutinin fasse ich als die Folge eines Schutzkolloids im Serum auf. Als solches Schutzkolloid kommt wohl das Albumin in Betracht, das als selbst gut stabiles, höher disperses Element der Eiweißlösung das labilere Globulin in Lösung hält. Von den Agglutininen ist es bekannt, daß sie, wie alle Antikörper, zur Globulinfraction gehören.

Diese Zurückhaltung der Globuline samt den mehr oder weniger fest mit ihnen verbundenen Agglutininen braucht keine völlige zu sein; sie wird um so geringer sein, je mehr durch Kochsalzlösungszusatz, d. i. eben Serumverdünnung in der Kochsalzreihe, die Albumine verdünnt und voneinander getrennt werden. Der Punkt, an dem gar keine Agglutinine mehr gegenüber dem chemisch-physikalischen Beladungsreiz der Bakterien festgehalten werden, wird daran erkannt, daß $20/20$ der dargebotenen Agglutinationseinheiten von den Bakterien adsorbiert sind.

Das ist auch der Punkt, an dem das Agglutinationsoptimum eintritt.

In der Reihe von diesem Punkt nach rechts gehend werden ebenfalls ständig alle $20/20$ der dargebotenen Agglutinationseinheiten von den Bakterien adsorbiert. Aber da die Bakterienmenge gleich bleibend ist, während die Agglutininmenge infolge zunehmender Verdünnung stets sinkt, ist bald nicht mehr genügend Agglutinin zur vollständigen Agglutination, eben dem Optimum, zur Verfügung.

Wir machen also durch den Zusatz von Kochsalzlösung die Agglutinine sozusagen erst völlig frei. Der unter solchen Verhältnissen bestimmte Titer bezieht sich nur auf Kochsalzverdünnung. Nehmen wir an Stelle der Kochsalzlösung Normalserum, so können wir nur einen geringen Anteil der im spezifischen Serum laut Kochsalzreihe enthaltenen Agglutinine in die Wirkung treten lassen. Der „Normalserumtiter“ in diesem besonderen Sinne steht stets mehr oder weniger weit unter dem „Kochsalztiter“.

6. Die von mir aufgestellte Annahme, zu der ich durch meine Versuche in allerdings nur teilweiser Bestätigung der Ausgangshypothese gekommen bin, darf sich wohl auch auf alle anderen eiweiß-

artigen Antikörper übertragen lassen. Für die Präcipitine, um nur ein Beispiel zu nennen, ist es bekannt, daß erst bei Kochsalzverdünnung des Antigens die Ausfällung stattfindet¹⁾.

Ganz allgemein werden häufig Hemmungszonen in konzentrierten Serumverdünnungen beobachtet.

Der Umstand, daß Antikörper erst durch Kochsalzlösungszusatz frei werden, scheint zur Erklärung einer Reihe von bisher auffallenden Beobachtungen bei der Infektion dienen zu können. Diese Frage soll noch weiter behandelt werden. Man bedenke nur, daß wir fast alle unsere Infektionsdosen, zum mindesten die gemessenen, in Kochsalzlösung dem Tierkörper einverleiben. Die Lokalantikörper werden dadurch, wenn auch vielleicht nur so lange, bis die Kochsalzlösung resorbiert ist, frei gemacht (Unterschied in der Wirkung, ob man Tuberkelbacillen im Sputum oder in Kochsalzlösung injiziert u. a. m.).

Die Zurückhaltung im unverdünnten Serum oder im gewissen Sinne bei Verteilung zwischen Serum und Bakterien spielt auch für Desinfektionsvorgänge eine Rolle, ebenso wie für die Färbung, bei der es sich auch so häufig um kolloidale Adsorptionen handelt. An dieser Stelle können alle diese Fragen nur ganz kurz angedeutet werden, die auch schon von anderen Autoren in ähnlichem Zusammenhang angeschnitten sind (Porges u. a.).

Schließlich sei noch mehr anhangsweise auf die Normalagglutinine eingegangen. Wie die Versuche ergeben, lassen diese sich auch aus unverdünntem Normalserum herausnehmen, und zwar auch durch heterologe Bakterien. Sie müssen also auch von den spezifischen Agglutininen kolloid-chemisch verschieden sein. Wo sie in größerer Zahl vorhanden sind, z. B. im Normal-Eselserum gegen Y, da treten auch sie nur in der Kochsalzreihe voll in die Erscheinung, werden dagegen in Normal-Eselserum als Verdünnungsmedium zum Teil festgehalten²⁾.

Die spezifischen Agglutinine verhalten sich ganz anders als die Normalagglutinine. Wie Manteufel und Beger im Reichsgesundheitsamt nachgewiesen haben, lassen sich aus spezifischen Seris die spezifischen Anteile für eine ganz bestimmte Bakterienart und die Nebenagglutinine nur dann völlig durch Bindung mit dieser Art herausnehmen, wenn das Serum 1 : 100 mit Kochsalzlösung verdünnt ist. Bei unverdünnten oder schwach verdünntem Serum gelingt die restlose Herausnahme nicht.

¹⁾ Hierüber wird in einer weiteren Mitteilung berichtet werden.

²⁾ Dieser Versuch beweist wieder, wie stark die Titerfestsetzung von der in dem Versuch genommenen Bakterienart abhängig ist, eine ja allbekannte Erscheinung. Neben die Bakterienart tritt als hochgradig bestimmend nunmehr auch das Verdünnungsmedium.

Literaturverzeichnis.

- Abderhalden, Zitiert nach Hammarsten, Physiologische Chemie. 1899. — Bunge, Zitiert nach Hammarsten, Physiologische Chemie. 1899. — Bürgi, Über Bakterienagglutination durch normale Sera. Arch. f. Hyg. 62. — Eisenberg und Volk, Untersuchungen über die Agglutination. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 40. — Gildemeister, E., Einfluß erhöhter Temperaturen auf die Oberflächenspannung von Bakterienaufschwemmungen. Zentralbl. f. Bakteriöl., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., 83. 1919. — Herzfeld und Klinger, Neuere eiweißchemische Vorstellungen in ihren Beziehungen zur Immunitätslehre. Weichardts Ergebnisse der Bakteriologie 1920. — Hirschfeld, H., Einfluß der Temperatur auf die agglutinierende Substanz. Arch. f. Hyg. 60. — Lange, L. und Nitsche, Die Ligninausschüttelung der Tuberkelbacillen, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 67. — Manteufel und Beger, Weitere Ergebnisse zur Paratyphusfrage. Zentralbl. f. Bakteriöl., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., 81, Heft 3. 1921. — Meyer, H., Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 1899—01. — Müller, P. Th., Vorlesungen über Infektion und Immunität. Jena 1917. — Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901. — Paltauf, Th., Die Agglutination in Kolle-Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen 1913. — Porges, Otto, Über die Beziehungen zwischen Bakterienagglutination und Ausflockungserscheinungen der Kolloide. Zentralbl. f. Bakteriöl., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., 40. — Wassermann, A., Über Agglutinine und Präcipitine. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 42.
-