Versuche über die Erzeugung hochwertiger Agglutinationssera und über die Beziehungen zwischen Bakterien und Agglutinin.

Von Werner Rosenthal.

Aus dem hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen.

Nach einem Vortrag in der Sitzung vom 18. Januar 1904, abgeschlossen im Mai 1904.

Die Versuche, über welche ich hier kurz berichten will, waren veranlaßt durch die große Bedeutung, die das Agglutinationsphänomen in diagnostischer Hinsicht hat, sowohl für die klinische Diagnose durch Feststellung einer spezifischen Wirkung des Serums eines Kranken auf eine bestimmte Bakterienart, als auch für bakteriologische Untersuchungen durch Feststellung der spezifischen Wirkung eines künstlich erzeugten Immunserums auf einen fraglichen Bakterienstamm.

Für die letztere Untersuchungsmethode gilt es allgemein als wünschenswert, ein möglichst hochwertiges Immunserum zu verwenden. Für den in der Praxis häufigsten Fall, die Verifizierung eines verdächtigen Bakterienstammes als Typhusbakterium, wird von manchen Seiten ausdrücklich die Verwendung eines Serums gefordert, das noch in der Verdünnung 1 : 10000 deutlich agglutinierende Wirkung habe. Solche auf Typhusbazillen wirksame Sera sind aber nicht im Handel zu haben; jedes Institut muß sie sich selber zu erzeugen suchen, wenn es nicht auf gütige Geschenke seitens anderer Institute angewiesen sein will. Noch mehr gilt dies von Sera, die auf andere Bakterien, z. B. Ruhr, Paratyphus, eine spezifische Wirksamkeit haben. Ich habe aber meine Versuche allein auf die Erzeugung eines Typhusagglutinins beschränkt, um sie nicht

unnötig zu komplizieren und um so zunächst dem dringendsten praktischen Bedürfnis zu dienen. Aus äußeren Gründen habe ich sie auch nur in geringem Umfang, an wenigen Tieren im Verlauf von $1^1/_2$ Jahren, angestellt.

Es gibt noch keine allgemein bekannte Vorschrift, wie bei der Immunisierung zum Zweck der Agglutiningewinnung am besten zu verfahren sei. Es gilt nur als zweckmäßig, möglichst große und widerstandsfähige Tiere zu wählen und zur Erzielung der höheren Immunisierungsgrade lebende Bakterien intravenös zu injizieren. Für kleinere Institute aber können kaum größere Tiere in Betracht kommen als Kaninchen, insbesondere wenn man als erstrebenswertes Ziel ins Auge faßt, spezifische Sera gegen eine größere Zahl von Krankheitserregern jederzeit vorrätig zu haben. Hunde ließen sich allenfalls verwenden, aber das Halten einer Anzahl Hunde ist doch schon lästiger und kostspieliger als das von Kaninchen, die ich deshalb ausschließlich benützte.

Die intravenöse Injektion lebender Typhusbazillen ist nun nicht gefahrlos, da sich ein Verspritzen der Injektionsflüssigkeit nicht durchaus sicher vermeiden läßt; es wird auch berichtet, daß nach einem solchen Zufall Arzt und Gehilfe an Typhus, und zwar anscheinend gerade durch den verwendeten, durch seine geringe Agglutinabilität sich auszeichnenden Stamm, erkrankt sind. Da es sich bei der Beschaffung eines hochwertigen Agglutinationsserums nicht um eine therapeutische wichtige Maßnahme, sondern nur um ein nützliches Hilfsmittel zu bakteriologischen Untersuchungen handelt, hielt ich mich nicht für berechtigt, mich und den Gehilfen dauernd einer derartigen, wenn auch noch so geringen Gefahr auszusetzen. Ich richtete deshalb mein Augenmerk darauf, ohne lebende Bakterien ein gut wirkendes Serum zu erlangen.

Anfangs verwendete ich auf den Rat des Herrn Prof. Heim durch einstündiges Erhitzen auf 64° abgetötete Typhusbakterien, die ich subkutan einverleibte. Es zeigte sich aber, daß mit diesen hohe Agglutinationswerte nicht zu erreichen waren. Denn wenn man am schon immunen Tier die Dosen zu steigern oder öfters zu geben suchte, so erkrankten die Tiere schwer und gingen ein, ohne wesentliche Steigerung des Agglutinationswertes (über die Wirksamkeit in einigen Tausendsteln

Verdünnung hinaus) zu zeigen. Ich verwendete dann Bakterienkulturen, die ich durch Formalin abgetötet hatte, und diese zeigten sich geeigneter. Dann ging ich dazu über, den schon durch anfängliche subkutane Impfung immunisierten Tieren kleine Gaben formolisierter Bakterien intravenös zu injizieren. Auf diese Weise erhielt ich bald Agglutinationswerte von mehr als $^1/_{10000}$ ja bis $^1/_{30000}$, die also allen Anforderungen entsprachen und zwar unter Verwendung von schon längere Zeit im Laboratorium fortgezüchteten Stämmen.

Ich stellte einige Parallelversuche folgendermaßen an, wobei mich Herr Dr. Rösle freundlichst unterstützte: junge, ungefähr gleich schwere Kaninchen eines Wurfes erhielten an den gleichen Tagen Injektionen von Typhusbakterien; in dem einen Versuch wurde mit subkutanen Injektionen begonnen und an 3 Tieren die Wirkung lebender, erhitzter und formolisierter Bakterien verglichen. Das mit lebenden Bakterien zu behandelnde Tier erhielt zunächst auch eine Injektion von erhitzten Bakterien, wie es üblich ist, und die Dosen lebender Bakterien wurden bei ihm kleiner gewählt; im letzten Stadium des Versuchs mußten auch einige Injektionen bei ihm ausfallen, weil es viel länger dauernden Gewichtsverlust aufwies als die beiden anderen. Aber vorher noch wurden dieses Tier und das mit formolisierten Bakterien behandelte intravenös injiziert, bei dem dritten aber die subkutane Injektion größerer Dosen erhitzter Bakterien fortgesetzt.

Das Ergebnis war, daß der Agglutinationswert des jedesmal am 10. Tage nach der vorausgegangenen Impfung entnommenen Serums bei dem mit formolisierten Bakterien behandelten Tier am gleichmäßigsten und eher noch höher anstieg als bei dem mit lebenden Bakterien behandelten, wesentlich stärker (auf die doppelte Verdünnung) als bei dem mit erhitzten Kulturen injizierten. Dabei stieg aber auch das Gewicht des erstgenannten Tieres am meisten und zeigte nach den späteren intravenösen Injektionen keine oder rasch vorübergehende Abnahme im Gegensatz zu den schweren und langdauernden Gewichtsverlusten des mit lebenden Bakterien behandelten Tieres.

In einem zweiten Parallelversuch wurden nur subkutane Injektionen gleichgroßer Dosen, einmal von formolisierten und das anderemal von Kulturen, die durch einstündiges Erhitzen

auf 61—62° abgetötet waren, miteinander verglichen, und wieder wurde durch die formolisierten Bakterien der doppelte Agglutinationswert bei stärkerer Gewichtszunahme erzielt als mit den erhitzten.

Es scheint also, daß man durch häufigere kleine intravenöse Gaben formolisierter Bakterien ebenso wirksame Agglutinationssera erzeugen kann als durch lebende Bakterien, und daß man daher die gefährliche Handhabung der letzteren ohne Schaden vermeiden kann. Ob man auf diese Weise auch ebenso wirksame bakterizide Sera erhält, ist eine noch zu lösende Frage.

Übrigens scheint es mir nach den späteren Versuchen, die leider infolge Zugrundegehens einzelner Tiere nicht als Parallelversuche fortgeführt werden konnten, daß man auch mit erhitzten Bakterien ähnliche Erfolge erzielen kann, wenn man dieselben nicht über 61° erhitzt, was ja zur sicheren Abtötung der hier in Frage kommenden Bakterienarten vollkommen genügt, und wenn man ebenfalls kleine intravenöse Injektionen anwendet. Die Abtötung durch Aufschwemmen in 1 % Formolwasser ist jedoch bequemer als die durch Erhitzen.

Bei alledem ist das Problem, wie ohne allzu große Aufwendungen an Tieren und Arbeit in einem kleinen Institut verschiedene spezifische Sera vorrätig gehalten werden können, noch nicht gelöst. Denn es ist viel schwerer, die Kaninchen für längere Zeit auf einem hohen Agglutinationswert zu halten, als sie in 4—6 Wochen auf einen solchen zu bringen.

Nachdem ich durch die geschilderten Versuche recht hochwertige Agglutinationssera erhalten hatte, benützte ich diese auch zu einigen Versuchen, die sich auf die praktische Ausführung der klinischen (Gruber-Widal-) Agglutinationsprobe und auf die Theorie der Agglutination beziehen.

Die letztere ist ein so weitgreifendes Problem, mit dem zur Zeit die berufensten Forscher sich beschäftigen, daß es besser ist, in seine Erörterung hier gar nicht einzutreten, als es oberflächlich darzustellen. Die folgenden Versuche beruhen auf der feststehenden Tatsache, daß die hypothetische wirksame, agglutinierende Substanz, das Agglutinin, durch die agglutinablen Bakterien gebunden wird; wie ebenfalls von einigen Forschern durch sinnreiche Versuche gezeigt werden konnte, läßt sie sich

auch wieder von ihnen trennen, scheint also bei dieser Bindung nicht zerstört oder wesentlich geändert zu werden, so daß es sich um eine lockere chemische Bindung oder um eine feste Lösung oder auch um Adsorption handeln kann.

Ich suchte nun die quantitativen Beziehungen von Bakterien und Agglutinin zu bestimmen: Beziehungen, aus denen man einerseits Fingerzeige für die zweckmäßigste Gestaltung der diagnostischen Agglutinationsversuche ableiten kann, und die auch als Material für theoretische Untersuchungen dienen können.

Ich verwendete zu meinen Untersuchungen nach dem Pröscher'schen Verfahren durch Formolzusatz zu einer jungen Bouillonkultur, Sedimentieren und Dekantieren vom Sediment hergestellte Emulsionen toter Bakterien, so daß ich reichliches, gleichmäßiges und unveränderliches Bakterienmaterial hatte. Die Agglutinationsproben stellte ich in kleinen Reagensröhrchen an, die ich bei 40° etwa 24 Stunden hielt und öfters makroskopisch und mit der Lupe untersuchte: das Verhalten nach 24 Stunden wurde als entscheidend betrachtet; ich habe auch bei längerer Beobachtung wohl noch ein weiteres Sedimentieren feiner Flöckchen, doch niemals ein Fortschreiten der Agglutination über den nach etwa 20 Stunden eingetretenen Zustand beobachtet. Andererseits muß ich, unter den angegebenen Bedingungen, nämlich einwandfreie formolisierte Emulsion, Beobachtung mindestens 20 Stunden bei 40° und Gebrauch einer Lupe, diese Beobachtungsweise für ebenso empfindlich und zuverlässig halten wie irgendeine mikroskopische. Sie ist aber für Untersuchungen, wie die vorliegende, bei denen eine große Reihe von Proben zu vergleichen ist, viel geeigneter als die mikroskopische Beobachtung.

Ich setzte die Proben so an, daß in der gleichen Flüssigkeitsmenge, 2 ccm, sowohl wechselnde Serum- als auch Bakterienmengen enthalten waren. Zur Verdünnung wurde sterile 0,85 % Kochsalzlösung benützt; die Bakterienmengen betrugen $^1/_2$, 1 und $1^1/_2$ ccm Bouillonkultur in den 2 ccm; 1 ccm entspricht der Pröscher'schen Vorschrift. Die Serumverdünnungen waren so gewählt, daß 2 nach den Potenzen von 2 fortschreitende Verdünnungsreihen ineinander eingeschoben waren, also z. B.: $^1/_{300}$, $^1/_{450}$, $^1/_{600}$, $^1/_{900}$ u. s. w.; die Stufen enger zu wählen, ist

nach meinen Erfahrungen zwecklos, weil man dann doch keine deutlichen Unterschiede von Stufe zu Stufe erhält.

Man kann das Ergebnis dieser Versuche in zweierlei Art betrachten: einmal, indem man die einzelnen Reihen mit gleichem Bakterienzusatz nach der Serumverdünnung bezeichnet und ordnet, und einmal, indem man sie nach den aufeinander wirkenden Mengen von Serum und Bakterien, also von Agglutinin und agglutinabler Substanz bezeichnet, wobei man willkürliche Einheiten für diese beiden Reagenzien wählen kann, da wir ja keines seinem Gewichte nach bestimmen können.

Bei der ersten, der üblichen Betrachtungsweise ergibt sich, daß die Agglutinationsprobe nach 24 Stunden desto empfindlicher ist, je dünner die Bakterienaufschwemmung ist. Aber es ist interessant, daß sie auch annähernd dreimal so empfindlich ist, wenn eine dreifach dünnere Bakterienemulsion benützt wird, z. B. $^1/_{18200}$ zu $^1/_{7200}$ als Grenzwerte der vollständigen Agglutination, was schon auf eine quantitative Beziehung zwischen Agglutinin und agglutinabler Substanz hinweist. Deutlicher ist dies noch bei der zweiten Bezeichnungsweise. Wenn ich z. B. in einem andern Versuch die Einheit des Agglutinins mit A, entsprechend $^1/_2$ ccm des 7200mal verdünnten Serums, die Einheit der Bakterien mit B, entsprechend $^1/_2$ ccm der verwendeten Bouillonkultur, bezeichne, so ergab sich nach 24stündiger Einwirkung in 2 Reihen, von denen die eine dreifach so konzentriert war als die andere, daß ausgereicht hatten: zur vollständigen Agglutination und Klärung der Flüssigkeit, so daß eine einzige Bakterienwolke am Boden des Röhrchens lag: 6 A auf 1 B in der dünneren, 4 A auf 1 B in der konzentrierteren Probe; zur vollständigen Agglutination, so daß Flöckchen in klarer Lösung schwammen:
$1^1/_2$ A auf 1 B in der dünneren, 2 A auf 1 B in der konzentrierteren Probe; zur eben kenntlichen Flockenbildung in der trüben Flüssigkeit: 1 A auf 1 B in der dünneren, $^3/_4$ A auf 1 B in der konzentrierteren Probe.

Die beiden Reihen unterschieden sich also immer nur um einen Grad in der Skala der Verdünnungen, und zwar bei den verschiedenen Grenzwerten nicht im gleichen Sinne, so daß man als mittleres Ergebnis auf eine quantitative Beziehung zwischen Agglutinin und Bakterien schließen kann, die von dem Verdünnungsgrad unabhängig ist.

Das ist der Endausgang der Reaktion; ganz anders ist der zeitliche Verlauf: hier erscheint, bei dieser quantitativen Bezeichnungsweise, die Konzentration als ein die Reaktion förderndes Moment, denn nach $^1/_2$ Stunde haben schon 3 A auf 1 B in der konzentrierten, aber erst 8 A auf 1 B in der dünneren Lösung eine erkennbare Flockung herbeigeführt. In der üblichen Bezeichnungsweise heißt das, daß die Bakterienmenge kaum Einfluß auf das Ergebnis hat bei kurzer Beobachtung, denn beidemal war die Serumverdünnung in der angesetzten Probe $^1/_{3000}$. Fast ebenso war das Verhältnis auch nach 2 Stunden noch.

Wir können daraus ersehen, daß bei dem zu diagnostischen Zwecken üblichen Verfahren, wobei nach höchstens 2 Stunden das Auftreten von Flockung festgestellt sein soll, die Bakterienmasse von geringem Einfluß auf das Resultat ist, und daß also gegen das übliche wenig genaue Verfahren beim Herstellen der Bakterienaufschwemmungen nichts Triftiges einzuwenden ist. Wenn man aber, um den genauen Agglutininwert zweier Sera zu vergleichen, zu dem oben geschilderten Verfahren greift, was ich für zweckmäßig halte, so wird es sehr wichtig sein, auch immer die gleiche Bakterienmenge in der Flüssigkeitseinheit zu verwenden. Daß für den zu bestimmenden Grenzwert eines Serums auch noch sehr viele andere Faktoren, vor allem die Eigenart des zur Prüfung verwendeten Typhusbakterienstammes, von Bedeutung sind, ist bekannt.

Eine interessante gleichfalls bekannte Tatsache ist es, daß die Bakterien das Vielfache der Agglutininmenge zu binden vermögen, die zu ihrer vollständigen Agglutination nötig ist. Ich versuchte diese Beziehung zahlenmäßig festzustellen, indem ich im Anschluß an den eben des näheren wiedergegebenen Versuch aus allen den Röhrchen, in denen nach 24 Stunden eine vollständige Klärung der obenstehenden Flüssigkeit erfolgt war, je $^1/_2$ ccm dieser klaren Lösung abpipettierte und aufs neue mit Typhusbakterien, nämlich mit $^1/_2$ ccm der aufs Doppelte verdünnten ursprünglichen Emulsion (also mit $^1/_2$ B nach der oben eingeführten Bezeichnungsweise) zusammenbrachte.

Ich beobachtete dann, in welchen dieser Proben noch eine vollständige Agglutination statt hatte, und da der Hauptversuch ergeben hatte, daß 2 A auf 1 B zu dieser sicher genügten, war

also in den abpipettierten Proben, in denen keine vollständige Agglutination nach mehr als 24 Stunden eintrat, sicher weniger als 1 A Agglutinin noch vorhanden gewesen.

Da $^1/_4$ des Volums abpipettiert war, ergibt sich für das noch freie gelöste Agglutinin der ursprünglichen Proben 4 A als obere Grenze; aus den beiden Versuchsreihen läßt sich so berechnen, daß die Bakterien mindestens die 14fache, beziehungsweise 12,3fache Menge des zu ihrer vollständigen Agglutination nötigen Agglutinins gebunden hatten, 2 Werte, die für die Art der Beobachtung und Berechnung mir sehr gut zueinander zu stimmen scheinen, die dagegen von dem von Arrhenius und Madsen bestimmten Verteilungsgesetz weit abweichen.

Ich will aber auf eine Diskussion dieser Abweichung hier nicht eingehen, vor allem, weil meine Versuche dazu bei weitem vervielfältigt und variiert werden müßten, woran ich durch dringende andere Arbeiten verhindert war, so lange mir so gute hochwertige Sera zur Verfügung standen. Ich gedenke sie wieder aufzunehmen, sobald ich wieder über solches Serum in reichlicher Menge verfügen werde.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Sitzungsberichte der Physikalisch-Medizinischen Sozietät zu Erlangen

Jahr/Year: 1904

Band/Volume: 36

Autor(en)/Author(s): Rosenthal Werner

Artikel/Article: Versuche über die Erzeugung hochwertiger Agglutinationssera und über die Beziehungen zwischen Bakterien und Agglutinin 292-299