

Zusammenfassung. Nach subkutaner Injektion von Polyvinylalkohollösung entwickeln Ratten innerhalb eines Monats arteriellen Hochdruck. Gleichzeitig beobachtet man Vergrößerung von Leber, Milz, Herz und Nieren, sowie Thymusatrophie, jedoch keine Nebennierenvergrößerung. Es wird daher vermutet, dass diese Hypertonie, ähnlich der durch Methylcellulose hervorgerufenen,

eine Folge von gestörter intraglomerulärer Durchblutung ist.

C. E. HALL and O. HALL

The Carter Physiology Laboratory, University of Texas Medical Branch, Galveston (USA), October 16, 1961.

Der Nachweis praeципitierender Casein-Antikörper im Agar

Für das Aufdecken von Nahrungsmittel-Antikörpern standen uns bis jetzt vier Verfahren zur Verfügung: (1) Die Praecipitin-Reaktion, welche mit dem Vorteil der technischen Einfachheit und mit dem Nachteil der geringen Sensibilität behaftet ist. (2) Die Komplementbindungsreaktion, die ca. zehnmal empfindlicher als die Praecipitinreaktion ist. Ihr Nachteil liegt in der geringen Spezifität, im Verbrauch von viel Serum, sowie in der umständlichen Technik, die das Ansetzen zahlreicher Kontrollen erfordert. (3) Die Prüfung auf Antikörper durch Injektion des Antigens in die Haut gibt häufig unspezifische Resultate. Es ist bekannt, dass Allergien des Magen-Darmtraktes durch Hautreaktionen meistens nicht erfasst werden können. (4) Der Haemagglutinations-Test, den wir vor einigen Jahren für den Nachweis von Nahrungsmittel-Antikörpern eingeführt haben^{1,2}, hat trotz der von anderer Seite^{3,4} erfolgten Prüfung und Bestätigung keine weitere Verbreitung gefunden. Mit anderen Worten: Von den sub 1–3 angeführten Methoden entspricht hinsichtlich des Sensibilitätsgrades sowie der Spezifität nicht eine den Ansprüchen kritisch eingestellter Kliniker, während man über den Wert des Haemagglutinationstestes wegen seiner bisherigen geringen Verwendung keine sichere Aussage abgeben kann.

Angesichts des in der praktischen Bedeutung der angeführten serologischen Verfahren begrenzten Wertes für den Nachweis von Nahrungsmittel-Antikörpern entschlossen wir uns eine 5. Methodik zu benutzen, welche eine Variante der ersterwähnten darstellt.

Für unsere Untersuchungen bedienten wir uns des Agardiffusionstests nach OUCHTERLONY⁵, der in der Serologie der letzten Jahre in zunehmendem Masse Anwendung gefunden hat. Aus dem Gros der hier zu erwähnenden Versuche seien nur die von HAINER et al.⁶ mittels des Ouchterlony-Testes vorgenommenen Studien über Antikörper gegen Kuhmilch, sowie gegen Gliadin erwähnt, in denen unsere früheren, mittels der Komplementbindungsreaktion sowie des Haemagglutinationstestes erhaltenen Befunde bestätigt wurden.

Methoden und Material. Wir benutzten eine Mikromodifikation auf Objekträgern des Agardiffusionstests nach OUCHTERLONY⁵, bei der man mit 0,2 ccm Serum und 0,1 ccm Antigenlösung auskommt. In das auf die Objekträger ausgegossene 2% Agargel (2,5 ccm Agar pro Objekträger) wurden fünf runde Löcher mit einem Durchmesser von 9 mm gestanzt. Der Abstand der Löcher voneinander war 5 mm. In die vier um das zentrale Antigenreservoir gelegenen Löcher wurde das Serum in einer Verdünnungsreihe eingefüllt (Figur). (a) Agar. Der 4% in aqua dest. gelöste Difco-Agar wurde mit Veronalpuffer von pH 7,4 im Verhältnis 1:1 verdünnt. (b) Serum. Es wurde bei 56° 30 min inaktiviertes menschliches Serum von Neugeborenen (Nabelschnurblut), bei Kindern und Erwachsenen verwendet. (c) Antigen. Die

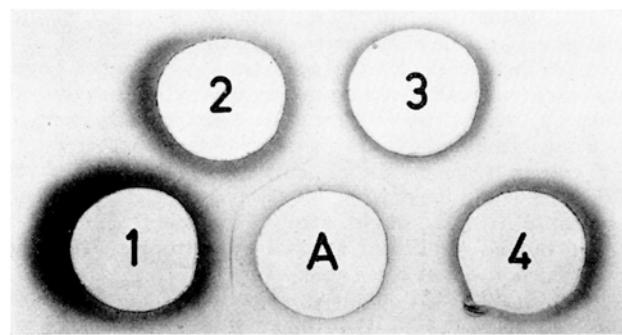
3,3% Lösung von Casein (nach Hammarsten) in verdünntem NaOH wurde mit n/10 HCl auf pH 7,2 gebracht. (d) Färben. Die getrockneten Präparate wurden mit Amidoschwarz gefärbt.

Ergebnisse. Die caseinpraezipitierende Antikörper enthaltenden Seren ergaben zwischen den mit Antigen und Serum gefüllten Löchern eine deutliche Praezipitationslinie, meistens bis zu einer Serumverdünnung von 1:8 (Figur). Bei der umgekehrten Versuchsanordnung (unverdünntes Serum in der Mitte, Antigen in einer Verdünnungsreihe in den äusseren Löchern) wurden mit den meisten Seren die gleichen Titer erzielt.

Zwecks Orientierung über den Wert des Ouchterlony-Testes für den Nachweis von Casein-Antikörpern untersuchten wir 235 Seren von 170 Personen sowohl mit der Haemagglutinationsreaktion als auch mit dem Ouchterlony-Test auf Casein-Antikörper. Die mit den beiden Methoden erhaltenen Befunde sind in Tabelle I wieder-

Tab. I. Der Nachweis von Casein-Antikörpern. Vergleich der mit dem Hämaggulatinations- und dem Ouchterlony-Test erhaltenen Resultate in 235 untersuchten Seren

Ouchterlony	positiv 19 Seren	negativ 216 Seren	total 235 Seren		
↓	↓	↓	↓		
Haemagglutination	positiv 12	negativ 7	positiv 68	negativ 148	total 235 Seren



Der Nachweis von Casein-Antikörpern im Agar. A 3,3% Caseinlösung, 1 unverdünntes Serum, 2 1:2 verdünntes Serum, 3 1:4 verdünntes Serum, 4 1:8 verdünntes Serum.

¹ E. BERGER und R. CH. BAUER, Exper. 15, 108 (1959).

² E. BERGER, Schweiz. Z. Path. Bakt. 22, 676 (1959).

³ W. E. PARISH, R. R. A. COOMBS et al., Lancet 1106 (1960).

⁴ M. GUNTHNER, R. R. A. COOMBS, et al., Immunology 3, 296 (1960).

⁵ O. OUCHTERLONY, Progress Allergy 5, 1 (1958).

⁶ D. C. HEINER und J. W. SEARS, Amer. J. Dis. Child. 100, 500 (1960).

gegeben. Es zeigt sich, dass die beiden Verfahren nur *beschränkt vergleichbare Ergebnisse erzielen*. So waren 7 der 19 im Ouchterlony-Test positiven Seren in der Haemagglutination negativ. Umgekehrt liessen sich bei 68 der im Ouchterlony-Test negativen Seren mittels der Haemagglutinationsreaktion Antikörper nachweisen. 10 dieser 68 in der Haemagglutination positiven Seren wurden mit «Carbowax» (Polyäthylen-Glycol) 3-10fach konzentriert. Aber auch in den konzentrierten Seren waren mit dem Ouchterlony-Test keine praezipitierenden Antikörper nachweisbar. Wodurch der verschiedene Ausfall der beiden Reaktionen bedingt wird, ist bis jetzt unbekannt. Es wäre denkbar, dass die durch die beiden Reaktionen erfassten Antikörper nicht gänzlich identisch sind, oder dass Hemmstoffe unbekannter Art interferierend bei der Antigen-Antikörperreaktion wirken.

Der Einfluss des Lebensalters. Wie Tabelle II zeigt, stammen die meisten der im Ouchterlony-Test *positiven Seren von Kindern des 1. und 2. Lebensjahres*. Nur einmal konnten von 78 untersuchten älteren Kindern und Erwachsenen caseinpraezipitierende Antikörper gefunden werden. Der Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen hinsichtlich des Auftretens von Casein-Antikörpern ist auffällig. Die Differenz lässt sich jedoch nicht statistisch berechnen, da bei der Gruppe der 1- bis 2jährigen eine Auslese vorliegt. Fanden sich doch bei den untersuchten

Kindern vornehmlich Probanden mit Allergieverdacht, während die Wahl der Erwachsenen zufällig erfolgte.

Diese Untersuchungen decken sich mit denen von LIPPARD, SCHLOSS und JOHNSON⁷, die nach der Verabreichung von Milch mit der Komplementbindungsreaktion fast bei allen Probanden zwischen dem 1. und 15. Lebensmonat Antikörper gegen *Kuhmilch* fanden, während zwischen dem 2. und 5. Jahr nur gelegentlich Antikörper nachzuweisen waren. Die grosse Ausbeute an positiven Resultaten bei LIPPARD, SCHLOSS und JOHNSON ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die genannten Autoren auf Antikörper gegen die gesamte *Kuhmilch* prüften, während wir bei der Untersuchung auf Antikörper gegen Casein nur einen *Teil des Kuhmilch-Antigens* erfassten.

Summary. It is possible to demonstrate antibodies against casein in the serum by the Ouchterlony technique. It is a simple technique and needs only a small amount of serum. In a few cases we could demonstrate antibodies against casein in sera, in which the hemagglutination-technique did not show positive results. In some cases, however, sera which were positive in hemagglutination-tests gave negative results by the Ouchterlony technique. The possibility is discussed that by the two techniques different kinds of casein-antibodies can be detected.

E. BERGER, A. BÜRGIN-WOLFF und M. JUST⁸

Serologisches Laboratorium des Universitäts-Kinderspitals, Basel (Schweiz), 16. Oktober 1961.

⁷ V. W. LIPPARD, O. M. SCHLOSS und P. A. JOHNSON, Amer. J. Dis. Child. 51, 563 (1936).

⁸ Für die Durchführung der serologischen Untersuchungen sind wir Fräulein CHRISTINE DYBALLA und Fräulein IRENE v. SCHWEINICHEN zu grossem Dank verpflichtet.

Tab. II. Der Einfluss des Lebensalters auf die Nachweisbarkeit von Casein-Antikörpern

Alter	positiv im Ouchterlony-Test	negativ
1. und 2. Lebensjahr	11 Kinder (12,5%)	77 Kinder (87,5%)
Kinder vom 3. Lebensjahr an und Erwachsene	1 Kind (1,26%)	78 Kinder (98,74%) und Erwachsene

of added trace elements, since yields of 330 and 325 mg/100 ml were obtained respectively. Similar effects could be observed with mycelium as inoculum.

A reversal of the above mentioned results was noted in experiments using the substrate poor in trace elements and inoculated with mycelium or conidia to give 4 to 20 viable units per 100 ml, i.e., growth rates and maximum yields increase over those observed with cultures inoculated with much larger inocula.

Experiments have been carried out in order to account for the above phenomena. The assimilating activity of mycelium has been tested after various stages of cultivation, since the age of the culture may have a relation to the effects caused by the size of the inoculum, and cultures originating from inocula of differing sizes have a different age at a certain stage of mycelial development. Dispersed mycelium has been produced under submerged conditions in a substrate without added trace elements which had been inoculated with $4 \cdot 10^6$ conidia per 100 ml. Samples were taken in the linear phase of growth (after 2 and 3 days), at the stage of maximum mycelial development (4 days), and in the phase of autolysis (6 days). The mycelial content was 164, 240, 362 and 268 mg/100 ml at the corresponding days of sampling. The mycelium of these samples was washed and inoculated into fresh medium (of the same composition as has been used for producing the inoculum) at a rate equivalent

Size of Inoculum and Growth Kinetics of Moulds

Growth rate and maximum yield of mycelium of various strains of *Aspergillus* proved to be markedly influenced by the size of the inoculum when grown in substrates poor in trace elements. Using *Aspergillus oryzae* in stationary cultures, linear growth rates of 2.52 and 0.45 mg/100 ml/h were obtained in a synthetic substrate (glucose 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.3 g; KH_2PO_4 , 4.54 g; Na_2HPO_4 , 4.73 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 15 mg; H_2O , 1 l) when $4 \cdot 10^7$ and $4 \cdot 10^3$ washed conidia respectively were inoculated per 100 ml of substrate. Under the same conditions except for the addition of the following trace elements, $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg; H_2O 1 l; the corresponding values were 6.68 and 3.12 mg/100 ml/h, thus indicating a much smaller relative difference. When certain other substrates with added trace elements were used, such as increasing the concentration of phosphates, the difference in rate of growth disappeared when the sugar concentration was relatively small. The maximum yields of mycelium obtained in the previously mentioned substrates were 260 and 180 mg/100 ml for the large and the small inoculum respectively when no trace elements were added, whereas the maximum yield was not significantly influenced by the size of the inoculum in the presence