[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.]
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Gaffky.)

Über den Einfluß erhöhter Temperaturen auf das Agglutinationsphänomen.

Von

Dr. I. W. Jobling
in Baltimore, Ma.

Der Einfluß gewisser Schädlichkeiten, wie erhöhter Temperaturen, Alkalien, Säuren usw. auf das Agglutinationsphänomen wurde bereits vor mehreren Jahren eingehend studiert. Diese Untersuchungen führten Bail, Eisenberg und Volk, sowie A. Wassermann dazu, die Agglutination als ein komplexes Phänomen aufzufassen. Nach der Annahme dieser Autoren waren auch hier sowohl für die agglutinable wie für die agglutinierende Substanz entsprechend den Ehrlichschen Lehren zwei verschiedene Gruppen, eine haptophore und eine funktionelle, in Tätigkeit. Dieser Schluß wurde deshalb gemacht, weil Bakterien, die einem gewissen Erhitzungsgrad, Temperaturen von 70° beispielsweise, ausgesetzt waren, sich wohl nicht mehr agglutinabel zeigten, dagegen noch imstande waren, Agglutinine zu binden. Der allgemeinen Anschauung folgend, wurden derartige Veränderungen in Analogie zu der Toxoidbildung gesetzt. Eine Reaktivierung der inagglutinablen Bakterien war nicht gelungen. In neuester Zeit haben nun Porges¹ sowie Dreyer den Einfluß erhöhter Temperaturen auf die Agglutinabilität der Bakterien von neuem zum Gegenstand sehr interessanter Studien gemacht. Porges fand, daß die Erhitzung auf 70 bis 80° Typhusbazillen und eine Reihe anderer

¹ *Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Therapie*. 1905. — *Centralblatt für Bakteriologie*. (Originale.) 1905. Bd. XL.

Bakterienarten in ihrer Agglutinabilität schwer schädigt, daß aber die Agglutinabilität dieser selben Bakterien, wenn sie nun längere Zeit auf 100° erhitzt werden, wiederum stark erhöht wird. Dreyer bestätigt diese Befunde. Porges sieht die Ursache dieses Phänomens in einer verschiedenen Beeinflussung der Proteine des Bakterienleibes. Bei der Erhitzung zwischen 70° bis 80° wird das Protein so modifiziert, daß es die Stabilität der Suspension erhöht.

Auf Veranlassung von Hrn. Prof. Wassermann, dem ich für die Anregung und fortlaufende Unterstützung meinen besten Dank sage, habe ich in dessen Laboratorium diese Frage experimentell untersucht. Meine Untersuchungen wurden ausgeführt an Typhusbazillen und Bakterien der Hgcholeragruppe, Schweinepest, Paratyphus B und Mäusetyphus. Zunächst können wir für Typhus die Angaben von Porges, sowie von Dreyer, daß nämlich die Erhitzung auf 70° die Agglutinabilität herabsetzt, die auf 100° sie wiederum erhöht, vollkommen bestätigen.

Was nun die Erklärung dieser Tatsache angeht, so glauben wir, dieselbe in folgender Weise gefunden zu haben. Zentrifugiert man zwei in 0.85 prozentiger Kochsalzlösung suspendierte Typhusbazillenkulturen, von denen die eine 1 Stunde auf 70°, die andere 1 Stunde auf 100° im Wasserbade erhitzt war, und wäscht man dieselben nach dem Zentrifugieren, so zeigt sich bei beiden schon makroskopisch ein großer Unterschied. Die auf 70° erhitzt gewesenen Bazillen bilden eine gallertige, schleimige Masse, die zu einer gleichmäßigen Suspension nicht mehr zu bringen ist, währenddem die auf 100° erhitzt gewesenen sich wie die ursprünglich unerhitzten Bakterien sehr leicht wieder zu einer diffusen Suspension in Kochsalzwasser bringen lassen. Erhitzt man die gleichen Bakterien, die vorher durch die längere Erwärmung auf 70° diese schleimige Beschaffenheit annahmen, nachträglich längere Zeit auf 100°, so verlieren sie diese schleimige Beschaffenheit und gewinnen ihre ursprüngliche gleichmäßige Suspendierbarkeit wieder. Also schon makroskopisch ergibt sich, daß die Erwärmung auf 70° auf den physikalischen Aggregatzustand der Bakterien anders einwirkt und zwar intensiver zerstörend als die auf 100°.

Tabelle I.

a) Immunserum vom Agglutinations-Titer 1:3000.

Nach Erhitzung auf	A g g l u t i n a t i o n s t i t e r	
	ungewaschene Bazillen	gewaschene Bazillen
70° (1 Stunde)	schleimig	schleimig
80° (1 „)	„	„
100° (1 „)	1:2000	1:2000

b) Normalserum vom Agglutinations-Titer 1:20.

Nach Erhitzung auf	A g g l u t i n a t i o n s t i t e r	
	ungewaschene Bazillen	gewaschene Bazillen
70° (1 Stunde)	schleimig	schleimig
80° (1 „)	„	„
100° (1 „)	1:20	1:20

Um nun die näheren Vorgänge zu studieren, die, auch nach unserer Auffassung ganz in Übereinstimmung mit Porges, sich, abgesehen von dieser Änderung des Aggregatzustandes, wohl hauptsächlich an den Eiweißstoffen des Bakterienleibes abspielen, haben wir folgende Experimente angestellt. Wir haben Typhuskulturen analog wie in den vorigen Versuchen in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, Röhrchen *a* auf 70°, Röhrchen *b* auf 100° 1 Stunde erhitzt. Alsdann wurde zentrifugiert, und sowohl die zentrifugierte Flüssigkeit als wie die abzentrifugierten und gewaschenen Bakterien auf ihr Verhalten gegenüber agglutinierendem Serum geprüft. Dabei ergab sich, daß die abzentrifugierte Flüssigkeit beim Versetzen mit agglutinierendem Serum sofort eine starke Präzipitierung ergab. Wurden dagegen die abzentrifugierten und gewaschenen Bakterien mit agglutinierendem Serum, dessen Titer vorher bestimmt war, versetzt, und wurde nun von neuem zentrifugiert und der Titer des obenstehenden Serums bestimmt, so zeigte sich, daß das Serum seinen alten Titer behalten hatte. Es hatten demnach sowohl die bei 70°, wie die bei 100° erhitzten und nach der Erhitzung gewaschenen Bakterien dem Serum keine in vitro nachweisbare Menge von Agglutinin mehr entzogen. Ein quantitativer Unterschied zwischen den auf 70° und 100° erhitzten Bakterien konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Dieser Versuch beweist demnach, daß bei der Erhitzung auf höhere Temperaturen der größte Teil der agglutinablen Substanz aus dem Innern des Bakterienleibes nach außen tritt und daß, wenn durch Waschen die dem Außenleibe anhaftende Substanz entfernt wird, eine Bindungsfähigkeit dieser Bakterien gegenüber Agglutininen wenigstens für Typhusbazillen in vitro nicht mehr nachzuweisen ist. Diese Versuche möge die nachfolgende Tabelle zeigen.

Tabelle II.

Bindung von Agglutinin an erhitzte Bazillen.

Je 5 Ösen erhitzter Bazillen werden in 5^{cem} physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und hierzu wird eine gleiche Menge, je 0.005^{cem}, agglutinierenden Serums hinzugefügt. Die Aufschwemmung gelangt für 1 Stunde in den Brutschrank und bleibt dann 24 Stunden bei Zimmertemperatur, dann

wird klar zentrifugiert und die klare Flüssigkeit auf ihre agglutinierende Fähigkeit unerhitzten Bazillen gegenüber geprüft.

Der Serومتiter war vor der Bindung 1:3000.

Bindung mit erhitzten Bazillen	Agglutinationstiter gegen- über unerhitzten Bazillen
1. 70° C. (1 Stunde)	1:100
2. 80° C. (1 „)	1:100
3. 100° C. (1 „)	1:100

Es ist also starke Bindung durch die erhitzten Bazillen erfolgt.

Tabelle III.

Fehlen der Bindung von Agglutinin an erhitzte, gewaschene Bazillen.

Die erhitzten Bazillen werden in Kochsalzlösung gewaschen und dann wie im vorigen Versuch behandelt.

Der Serومتiter vor der Bindung ist 1:3000.

Bindung mit erhitzten, gewaschenen Bazillen	Agglutinationstiter gegen- über unerhitzten Bazillen
1. 70° C. (1 Stunde)	1:3000
2. 80° C. (1 „)	1:3000
3. 100° C. (1 „)	1:3000

Die erhitzten Bazillen verlieren also durch das Waschen die Fähigkeit, Agglutinin zu binden.

Tabelle IV.

Zu der klaren Flüssigkeit, die man bei dem Zentrifugieren der erhitzten Bazillen erhält, wird eine gleiche Menge verdünnten agglutinierenden Serums (0.005 ^{ccm}) hinzugefügt. Hierauf läßt man ebenso wie in den obigen Tabellen binden. Hierbei entsteht ein Präzipitat.

Die Mischung wird dann zentrifugiert und die obenbleibende, klare Flüssigkeit auf ihren agglutinierenden Titer untersucht.

Der Serومتiter vor der Bindung ist 1:3000.

Bindung mit dem Kochsalzextrakt der auf folg. Grade erhitzten Bazillen	Agglutinationstiter
1. 70° C. (1 Stunde)	1:500
2. 100° C. (1 „)	1:500

Wurden nun derartige Bakterien, die ihr Bindungsvermögen in vitro, wie soeben angegeben, verloren hatten, Kaninchen eingespritzt, so waren sie trotzdem imstande, agglutinierendes Serum zu erzeugen.

Wenn wir also die bisherigen Versuche zusammenfassen, so ergibt sich, daß die Erhitzung auf 70° den physikalischen Zustand der Typhusbazillen stärker verändert als die auf 100°, und daß weiterhin bei jeder dieser Wärmeeinwirkungen der größte Teil der agglutinablen Substanz aus dem Bakterienleib austritt, so daß derartige Bakterien, sobald sie gewaschen sind, in vitro kein nachweisbares Bindungsvermögen für Agglutinin mehr besitzen. Daß sie aber trotzdem noch Reste der agglutinablen Substanz in sich haben, geht daraus hervor, daß derartige erhitzte und gewaschene Bakterien, Tieren einverleibt, dort noch agglutinierendes Serum erzeugen können. Allerdings machen sie das in erheblich geringerem Grade als die Flüssigkeit (Kochsalzlösung), in welcher sie während des Erhitzens suspendiert gewesen waren und welche, wie wir oben sahen, den größten Teil der aus dem Bakterienleib ausgetretenen präzipitablen i. e. agglutinablen Substanz enthält. Es handelt sich also bei diesem Phänomen darum, daß die agglutinable Substanz im Innern des Bakterienleibes bei der Erhitzung in beiden Fällen eine sehr starke Verminderung erlitten hat. Wir können nun aber weiter nachweisen, und bereits Porges¹ hat dieses angegeben, daß länger dauernde Erhitzung auf 100° die Ausflockbarkeit mancher Bakterienemulsionen, wozu auch Typhus gehört, sehr erleichtert, so daß derartige Bakterien nach länger dauernder Erhitzung auf 100° sogar zur spontanen Agglutination neigen. Demnach hätten wir uns das genannte Phänomen folgendermaßen zu erklären. Sowohl bei der Erhitzung auf 70°, wie bei der auf 100° tritt der größte Teil der agglutinablen Substanz aus dem Bakterienleib heraus. Infolgedessen können nur mehr geringe Mengen der agglutinierenden Substanz gebunden werden. Diese geringen Substanzen genügen zu dem Eintritt des sichtbaren Agglutinationsphänomens bei den auf 100° erhitzten Bakterien, weil diese Temperatur, wie wir oben sahen, erstens die physikalische Struktur der Typhusbazillen weniger zerstört als die Erhitzung auf 70° und weil zweitens die länger dauernde Erhitzung auf 100° Typhusbazillen überhaupt leichter agglutinierbar macht. Bei der Erhitzung auf 70° dagegen tritt diese auf physikalischem Gebiete gelegene Erhöhung der Agglutinierbarkeit noch nicht ein, und deshalb genügt die infolge des Austritts der agglutinablen Substanz sehr geringe Bindungsmöglichkeit für Agglutinin nicht, um die zur Agglutination nötige Menge agglutinierenden Serums zu binden. Die Tatsache,

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. 1905.

daß auf 70° erhitzt gewesene Bakterien durch nachträgliche Erhitzung auf 100° in ihrer Agglutinierbarkeit wieder erhöht werden können, steht damit im Einklang, daß, wie die obige Tabelle lehrt, diese nachträgliche Erhitzung auch die sichtbaren physikalischen Änderungen derartiger Bakterien wieder aufhebt. Auf die nach anderer Seite hin interessante Tatsache, daß die nicht nachweisbare Bindung in vitro kein Beweis dafür ist, daß tatsächlich nunmehr auch kein an lebende Rezeptoren bindungsfähiges Antigen vorhanden sei, eine Tatsache, die aus der gelungenen Herstellung agglutinierenden Serums mittels der gewaschenen und in vitro nicht mehr bindenden Typhusbazillen hervorgeht, sei nur hier nebenbei hingewiesen.

Daß nun tatsächlich diese Erklärung, die wir hier geben, die richtige ist, geht aus weiteren Versuchen mit den Bakterien der Hogcholeragruppe hervor. Denn während, wie wir bei Typhus sahen, die Erhitzung auf 70° die Bakterien schleimig macht, kurz, in ihrem physikalischen Zustand sehr stark verändert, währenddem die Erwärmung auf 100° es nicht tut, ist bei den Bakterien der Hogcholeragruppe ein nachweisbarer Unterschied in dieser Beziehung zwischen der Erwärmung auf 70° und 100° nicht fest zu beobachten. Und in der Tat zeigt sich denn nun auch, wie die nachfolgende Tabelle ergibt, bei diesen Bakterienarten die reaktivierende Wirkung der nachträglichen Erwärmung auf 100° sehr viel geringer als bei den von uns untersuchten fünf verschiedenen Typhusstämmen.

Tabelle V.

Schweinepestbazillen Ostertag II werden erhitzt und dann ohne und mit Kochsalzlösungswaschung auf ihre Agglutinationsfähigkeit untersucht.

Der Titer des Serums gegenüber unerhitzten Schweinepestbazillen Ostertag II war 1:3000.

Erhitzung auf	Ungewaschene Bazillen	Gewaschene Bazillen
1. 70° C. (1 Stunde)	1:750	1:750
2. 100° C. (1 „)	1:800	1:800
3. 100° C. (2 Std.)	1:1000	1:1000

Dasselbe mit Schweinepest Ostertag III.

Serumtiter für diesen Stamm 1:2000.

Erhitzung auf	Ungewaschene Bazillen	Gewaschene Bazillen
1. 70° C. (1 Stunde)	1:500	1:500
2. 100° C. (1 „)	1:800	1:800
3. 100° C. (2 Std.)	1:800	1:800

Dasselbe mit Paratyphus B.

Serumtiter für Paratyphus B 1:2000.

Erhitzung auf	Ungewaschene Bazillen	Gewaschene Bazillen
1. 70° C. (1 Stunde)	1:500	1:500
2. 100° C. (1 „)	1:800	1:800
3. 100° C. (2 Stdn.)	1:1000	1:1000

Demnach können wir das von Porges beschriebene Phänomen, wie schon erwähnt, vollkommen bestätigen und stimmen auch in der Art mit ihm überein, als wir annehmen, daß es sich bei dem Einfluß der verschiedenen Hitzegrade um die Wirkung auf die Eiweißsubstanzen handelt, welche dadurch in ihren allgemeinen physikalischen Suspensionsbedingungen verändert werden. Wir glauben indessen, daß an der bisherigen Auffassung der agglutinablen Substanz, wonach dieselbe als mit zwei Gruppen, einer haptophoren und einer funktionellen, i. e. die Koagulation der Eiweißkörper bewirkenden, ausgestattet zu betrachten ist, vorläufig nichts geändert zu werden braucht. Denn die scheinbare Reaktivierbarkeit durch die Erhitzung auf 100° erklärt sich nach dem Obigen angesichts der starken Abnahme der haptophoren Gruppen im Bakterienleib durch die allgemeine Zunahme der Agglutinierbarkeit durch diese Erhitzung. Qualitativ werden die im Bakterienleibe enthaltenen haptophoren und funktionellen Gruppen von der Erhitzung auf 70° und 100° nicht verschieden getroffen. Beide Hitzeeinwirkungen bewirken eine Verminderung der agglutinablen Substanz im Bakterienleibe. Qualitativ wird dagegen das physikalische Stabilitätsvermögen der Bakterien in Flüssigkeiten vermindert. Die Hitzeeinwirkung trifft also, wenn wir so sagen dürfen, nicht die spezifischen, bei der Agglutination in Betracht kommenden Substanzen, sondern sie erstreckt sich auf rein physikalische Momente.