Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“.
Serologische Abteilung (Leiter: Geh.-Rat Otto).

Über die Natur des d'Hérelle'schen Bakteriophagen.

Von R. Otto und W. F. Winkler.

In ihrer Arbeit über das d'Hérellesche Phänomen haben Otto und Munter (1) die Ursache der bei ihm in Erscheinung tretenden Bakterienauflösung auf die fermentative Wirkung allergeringster Bakterienteilchen, die bei dem Zerfall der lebenden Bakterien entstehen, zurückgeführt. Für diese Anschauung sprach besonders die Beobachtung, daß es gelang, aus lebenden Kulturen allein das Bakteriophage Virus zu gewinnen. Auch schon Bail (2) hatte mitgeteilt, daß er in einzelnen Fällen das Virus aus Kulturen gewonnen habe, und Gildemeister (3), der das lytische Agens in den in Stuhlausstrichen sich findenden „Flatterformen“ nachgewiesen hatte, konnte es ebenfalls mit besonderer (nicht näher beschriebener Technik) im Reagenzglas erzeugen.

Otto und Munter hatten weiter darauf hingewiesen, daß derartige von den Bakterien gelieferte Fermente seit längerer Zeit bekannt sind (Eijkmann, Conradi und Kurpjuweit), aber die Frage, ob die d'Hérelleschen Lysine mit den „Autotoxinen“ der letzteren Autoren identifiziert werden dürfen, offen gelassen. Auch hier soll diese Frage nicht näher erörtert werden, sondern nur noch auf die älteren Befunde über Bakterizidie von Bakterienfiltraten von Rahn, Faltin, Krencker usw. kurz hingewiesen werden (Literatur siehe bei Kruse [4]).

Bekanntlich hatte auch bereits Twort (5) vor d'Hérelle bei Mikrokokken, Kolibazillen usw. in „sekundären“ Kolonien ein bakterienspezifisches, filtrierbares, autolytisches Prinzip festgestellt, das bei 60° C zerstört wurde. Da eine Inaktivierung des Bakteriophagen erst bei 65° eintritt¹⁾, so hielt d'Hérelle (6) dieses für verschieden von dem Twortschen Agens. In Gemeinschaft mit Pozerski (9) hat er eine Reihe von Versuchen mitgeteilt, aus denen sich ergab, daß die Bakteriophagen bei den einzelnen Bakterienarten verschieden hitzebeständig sind. Bei Temperaturen über 60° beginnen sie sich abzuschwächen, erst die Erhitzung auf 75° inaktiviert sie vollständig. Versuche, welche wir selbst über die Hitzebeständigkeit unserer verschiedenen Bakteriophagen angestellt haben, ergaben sogar bei Bakteriophagen gegen dieselbe Bakterienart große Schwankungen hinsichtlich der Abtötungstemperatur. Wir glauben daher, allein auf Unterschiede in der Inaktivierungstemperatur hin die Nichtidentität der d'Hérelleschen und Twortschen Lysine noch nicht als gesichert ansehen zu können, sondern erst noch weitere Versuche abwarten zu sollen.

Ohne indessen hier näher auf diesen Punkt einzugehen, wollen wir im Folgenden kurz über einige Versuchsergebnisse berichten, welche über die Natur des Bakteriophagen weitere Aufklärung bringen dürften.

Zunächst haben wir die Bedingungen näher geprüft, unter denen das Virus sich aus Kulturen gewinnen läßt. Wir haben dabei den Eindruck gewonnen, daß gewisse Schädigungen der Bakterien hierzu förderlich sind. Diese können nach unseren Erfahrungen durch sehr verschiedenartige Momente bedingt werden. So wirkt z. B. der Zusatz von Filtraten alter Kulturen günstig auf die Lysinbildung, ferner die Behandlung der Bakterien mit Immunsorum²⁾, sowie schließlich bestimmte physikalische und chemische Eingriffe (Schütteln in Aqua dest., Zusatz kleiner Dosen Sublimat). Gerade diese Versuche scheinen uns von Wichtigkeit. Wenn z. B. von d'Hérelle und Pozerski über eine Aktivierung des durch Hitze abgeschwächten Bakteriophagen berichtet wird, so scheint uns stets die Möglichkeit gegeben, daß die Untersucher insofern einer Täuschung zum Opfer gefallen sind, als der Bakteriophage nicht aktiviert wird, sondern daß sich nur aus der zur Fortzucht benötigten Kultur neues Lysin gebildet hat. Der Zusatz des inaktivierten Bakteriophagen dürfte in der Tat nur die Bildung des neuen Lysins begünstigen (eigene Versuche).

Von besonderem Einfluß ist nach unseren Erfahrungen das Filtrieren durch Bakterienfilter, wie folgende Beispiele zeigen:

Mit Kultur Flexner 23 erhielten wir ein wirksames Lysin beim Filtrieren schon nach der 2. Passage¹⁾, beim Zentrifugieren erst nach der 7. Passage;

mit der Kultur Flexner 27: beim Filtrieren nach der 2. Passage, beim Zentrifugieren nach der 3. Passage;

mit der Kultur Flexner B: beim Filtrieren nach der 4. Passage, beim Zentrifugieren nach der 12. Passage;

mit der Kultur Coli mut.: beim Filtrieren nach der 6. Passage, beim Zentrifugieren nach der 12. Passage;

mit der Kultur Typhus B: beim Filtrieren nach der 4. Passage, beim Zentrifugieren überhaupt nicht (versucht bis zur 20. Passage). Regelmäßig war also beim Filtrieren schneller ein wirksames Lysin zu erhalten als beim Zentrifugieren.

Ähnlich wirkten — wie gesagt — andere Eingriffe. Der Zusatz von Immunsorum oder von Spuren von Sublimat begünstigte die Lysinbildung meist so, daß sich eine deutliche bakteriophagische Wirkung im Plattenversuch schon in der 1. bis 3. Passage nachweisen ließ, während ohne diese Behandlung dies erst in späteren Züchtungen gelang.

Im ganzen konnten wir bisher ein wirksames Lysin aus Kulturen allein 13mal gewinnen, und zwar gaben:

von 5 Flexner-Stämmen	5 ein Lysin
von 6 Y.-Stämmen	3
von 5 Shiga-Kruse-Stämmen	1
von 5 Kolistämmen	3; außerdem bildete auch
1 Typhusstamm	Lysin

Hierzu möchten wir noch besonders bemerken, daß die Gewinnung des Kolilylins uns erst gelang, als wir eine Bouillon von ganz bestimmter H-Ionenkonzentration (p_H 6,5) verwendeten. Die 3 Kolilylins waren im übrigen sehr schwer fortzuchtbar; eins zeigte merkwürdigerweise nur auf Ruhr- und Typhuskeime, aber nicht gegen den eigenen Stamm Wirksamkeit (gegen andere Kolistämme nicht geprüft; Virus eingegangen).

Die Bedeutung des Filtrierens als eines die Lysinbildung fördernden Momentes haben wir besonders hervor und weisen dabei auf die interessanten Mitteilungen von R. Ehrenberg (11) über die fermentative Wirkung filtrierter Kasein-Phosphatlösungen hin. Wir nehmen an, daß durch das Filtrieren eine besonders wirksame kolloidale Lösung der kleinsten Bakterienteilchen erzielt wird und daß dadurch zugleich störende größere Massenteilchen zurückgehalten werden. Adsorptionsversuche mit Virus, auf die wir an anderer Stelle zurückkommen werden, haben uns nämlich gezeigt, daß die Wirksamkeit der Lysine sehr leicht durch Adsorption an vorhandene oder der Bouillon zugesetzte gröbere Partikel abgeschwächt oder aufgehoben wird.

Wenn die Anschauung zutrifft, daß der Bakteriophage weiter nichts ist als eine kolloidale Lösung kleinster, bei der Auflösung oder „Selbstverdauung“ der lebenden Bakterien entstehender Bakterienteilchen, so war zu erwarten, daß ein mit einem „Virus“ (als einem Autolysat von bestimmter Beschaffenheit) hergestelltes Antiserum (Antilysin) auch Bordetsche Antikörper gegenüber diesen aus kleinsten Bakterienteilchen bestehenden Lysin enthielte. Es war ferner wahrscheinlich, daß sich zwischen diesem Serum und einem mit (abgetöteten) Vollbakterien derselben Bakterienart gewonnenen Antiserum (antibakterielles Serum) nachweisbare Differenzen ergeben würden.

Bereits Wollmann und Goldenberg (12) haben die Komplexbildung²⁾ zum Stadium der Natur des „Bakteriophagen“ herangezogen. Auf Grund ihrer Versuche diskutierten sie die Möglichkeit, daß der Bakteriophage spezifisch antigene Eigenschaften habe. Dies scheint uns allerdings aus ihren Versuchen, zumal der Text ihrer

¹⁾ Als „Passage“ bezeichnen wir die jedesmalige Bebrütung (24 Stunden bei 37°) von Teilen (einige Tropfen) der auf 58° C erhitzten (zentrifugierten oder filtrierten) Bouillonkultur mit frischen, lebenden Keimen in neuer Bouillon. Die Prüfung der Bouillon auf bakteriophagische Wirkung geschah in der Regel nur im Plattenversuch, indem auf eben ausgestrichenen Drygalski-Platten (mit Typhus-, Y., Flexner-, Shiga- bzw. Kolibazillen) je ein Tropfen Bouillonfiltrat (bzw. Zentrifugenklar) aufgetropft wurde. War Virus in der Bouillon gebildet, so zeigte sich dort, wo der Tropfen hingefallen war, kein Wachstum. Mit abnehmender Stärke des Virus traten im Tropfenbereich mehr oder weniger zahlreiche Kolonien auf; bei schwach wirksamen Filtraten sieht man nur noch mehr oder weniger zahlreiche Löcher (taches vierges) in dem Bakterienrasen. Bei ganz unwirksamer Bouillon findet sich ein gleichmäßiger Rasen auf der Platte. Die Abstufung in der Behinderung des Wachstums kann man auch bei dem Austropfen gradim verdünnter Lysine verfolgen. Auf die Vorteile der Plattenkultur zum Nachweis des Bakteriophagen haben kürzlich auch Watanabe (10) sowie d'Hérelle und Pozerski hingewiesen.

²⁾ In einer Fußnote zu ihrer Arbeit teilen Wollmann und Goldenberg mit, daß auch d'Hérelle selbst mündlich über die Frage der Komplexbildung durch den Bakteriophagen berichtet habe. Die Resultate, welche er (13) in seiner uns nachträglich bekanntgewordenen Monographie „Le Bactériophage, son rôle dans l'immunité“ mitteilt, sind nach unserer Ansicht wenig beweisend.

Auch Bordet und Ciuca (14) haben Versuche in dieser Richtung gelegentlich ihrer Untersuchung über das autolytische Serum in Aussicht gestellt.

Wir möchten hier kurz die Resultate anführen, die sie bezüglich Lysin-Neutralisation, Präzipitation und Agglutination erhalten haben. Bordet und Ciuca untersuchten 3 verschiedene Sera, und zwar: 1. ein Serum gegen einen normalen Kolistamm, 2. ein Serum gegen eine resistent gewordene Kultur des Kolistammes, 3. ein Serum gegen das Lysin. Dabei erhielten sie folgende Resultate:

	Neutralisation des Lysins	Präzipi- tation	Agglutinat. gegen	
			Koli normal	Koli resistent
1. Serum gegen d. norm. Kolist.	—	+	+	—
2. Serum gegen d. resist. Kolist.	+	+	—	—
3. Antilysin	+	+	+	—

¹⁾ Kabéshima (7) gibt 65–70°, Gratia und Jaumain (8) für Staphylokokken-Lysin 61–62°, für Koli-Lysin 65° an. — ²⁾ Vergl. weiter unten die Bemerkung zu der Arbeit von Wollmann und Goldenberg.

Arbeit störende Druckfehler enthält, nicht so ohne weiteres hervorzugehen; vor allem fehlen wichtige Kontrollen, z.B. über die Eigenhemmung der abgesättigten Sera. Diese sind aber dringend nötig, nachdem wir oben gesehen haben, daß durch das Digerieren mit Bazillenextrakten das Auftreten von Lysin (und damit von Antigen) begünstigt wird.

Wir sind im übrigen in ähnlicher Weise vorgegangen wie Wollmann und Goldenberg, benutzten indessen zu unseren Versuchen nicht Shiga-, sondern Flexner-Stämme und mit ihnen erzeugte Extrakte und Lysine (Bakteriophagen).

Zunächst prüften wir die Eigenhemmung der bei unseren Versuchen benutzten Antigene und Antikörper. Dabei zeigte sich, daß dem hochwirksamen Bakteriophagen im allgemeinen eine geringe, den Extrakten (Autolysaten) eine stärkere Eigenhemmung zukommt.

Wir haben sodann die beiden oben erwähnten Antisera in ihrer Bindungskraft gegenüber folgenden vier Antigenen geprüft:

1. gegenüber einem Flexner-Lysin
2. gegenüber einer Emulsion von Flexner-Bazillen
3. gegenüber einem Schüttelextrakt aus lebenden Flexner-Bazillen
4. gegenüber einem Schüttelextrakt aus abgetöteten Flexner-Bazillen.

Als Bakteriophage (Lysin) benutzten wir unser Virus V.2. Das Virus ist aus dem Stuhle eines Ruhrkranken gewonnen und mit Flexner-Bazillen seit längerer Zeit fortgezüchtet.

Die Bakterienemulsion war in der Weise hergestellt, daß eine Kolle-Schale einer 24stündigen Flexner-Kultur mit 5,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und durch gehärtete Papierfilter filtriert wurde. Die Bakterien wurden sodann 1 Stunde auf 60° erhitzt. (In einigen Versuchsreihen sind auch lebende Bakterien, die in gleicher Weise zu einer Emulsion verarbeitet waren, zu den Bindungsversuchen benutzt worden.)

Das Autolysat aus lebenden Bakterien wurde gewonnen, indem der Bakterienrasen einer Kolle-Schale nach 24stündiger Bebrütung mit 5,0 ccm Aqua dest. abgeschwemmt und 48 Stunden geschüttelt wurde. Dann wurde die Flüssigkeit scharf zentrifugiert und das Zentrifugenklar im Verhältnis 1:10 mit 5%iger Phenollösung versetzt.

Das Autolysat aus abgetöteten Bakterien wurde durch Abschwemmen mit Kochsalzlösung hergestellt. Nachdem die in dieser Lösung abgeschwemmten Bakterien durch einstündiges Erhitzen auf 60° abgetötet worden waren, wurde die Emulsion zentrifugiert, das Zentrifugat mit 5,0 ccm Aqua dest. aufgenommen, 48 Stunden geschüttelt, von neuem zentrifugiert und wie oben phenolisiert.

Bei den Komplementbindungsversuchen mit diesen 4 Antigenen zeigte sich nun, daß das antilytische Serum (unter Berücksichtigung der Eigenhemmung)

gut mit dem Lysin,
weniger stark mit der Bakterienemulsion und
verschieden stark mit den Autolysaten Komplement band (und zwar war die Reaktion bei den letzteren stärker bei Verwendung des Autolysates aus lebenden Keimen).

Auch das antibakterielle Serum gab mit dem Lysin Komplementbildung, und zwar kaum schwächer als mit der Bazillenemulsion und den Autolysaten. Im Gegensatz zu dem antilytischen Serum war aber die Komplementbindung mit dem Autolysat aus lebenden Bakterien meist nicht stärker, eher schwächer.

Es bestand also ein markanter Unterschied in der Komplementbindungsfähigkeit beider Sera, der sich besonders darin zeigte, daß das antilytische Serum (im Gegensatz zu dem antibakteriellen) 1. den Bakteriophagen stärker als die Bazillenemulsion, und 2. das Autolysat aus lebenden besser als das aus abgetöteten Keimen band. Hieraus darf man wohl auf eine gewisse Rezeptorengemeinschaft des „Bakteriophagen“ und des „Autolysates aus lebenden Keimen“ schließen.

In einer zweiten Versuchsreihe haben wir sodann die komplementbindende Kraft beider Sera geprüft, nachdem wir sie dreimal mit Flexner-Bazillen abgesättigt hatten. (Bei jeder Absättigung wurden 5,0 ccm Serumverdünnung 1:10 mit einer Oese frischer Kultur 2 Stunden bei 37° digeriert.)

Nachdem die fast regelmäßig verstärkte Eigenhemmung der abgesättigten Sera genau festgestellt war, zeigte sich, daß durch die Absättigung die Bindungskraft des Antilytins nur gegenüber den Bakterien deutlich herabgesetzt wurde. Dagegen verlor das antibakterielle Serum in der Regel gegen alle Antigene gleich stark an Bindungskraft.

Aus diesen Versuchen ergibt sich also, daß in dem antilytischen Serum zwar eine gewisse, mit den antibakteriellen Sera gemeinsame Antikörperquote vorhanden ist, daß es aber außerdem eine spezifische Quote besitzt, die in erster Linie mit dem Lysin reagiert und von den Bakterien wenig gebunden wird.

Weitere Versuche bezweckten die Feststellung, inwieweit das mit Bakterien abgesättigte Antilysin in seiner neutralisierenden Wirkung beeinflusst wird. Dabei zeigte sich, daß die Absättigung die Neutralisationskraft des Antilytins nicht aufhebt.

Zusammenfassung: Man kann das Auftreten des bakteriophagen Lysins durch verschiedene Eingriffe begünstigen. Dem Filtrieren durch Bakterienfilter kommt bei der Erzeugung des Virus eine besondere Bedeutung zu.

Das Lysin ist an kleinste Bakterienteilchen gebunden und stellt ein spezifisches, mit dem antigenwirkenden Bakterieneiweiß der abgetöteten Vollbakterien nicht kongruentes Antigen dar. Es steht in

seinem Bau dem des Autolysates aus lebenden Keimen nahe. Dementsprechend enthält das Antilysin neben antilytisch wirkenden Körpern u. a. auch eine bestimmte spezifische Quote von Bordetschen Antikörpern gegenüber dem Lysin.

Die Resultate zwingen hinsichtlich der Natur des „Bakteriophagen“ nicht zur Annahme eines besonderen ultravisiblen Mikroben, sondern sind durchaus mit der Anschauung vereinbar, daß das wirksame Agens beim d'Hérélleschen Phänomen in kleinsten, mit fermentativen Eigenschaften ausgestatteten Bakterieneiweißteilchen besteht, die sich beim Zerfall der lebenden Bakterien bilden.

1. D. m. W. 1921 Nr. 52. — 2. W. kl. W. 1921 Nr. 20 u. 37. — 3. B. kl. W. 1921 Nr. 46. — 4. Allgemeine Mikrobiologie, Leipzig 1910 S. 160. — 5. Lancet 1915. — 6. Zbl. f. Biol. 1921, 84, S. 863. — 7. Zbl. f. Biol. 1920, 83, S. 219. — 8. Zbl. f. Biol. 1921, 85, S. 882. — 9. Zbl. f. Biol. 1921, 85, S. 1011. — 10. W. kl. W. 1922 S. 53. — 11. Die Naturwissenschaften 1922 S. 20. — 12. Zbl. f. Biol. 1921, 85, S. 772. — 13. Le Bactériophage, son rôle dans l'immunité, Paris 1921 (Masson & Cie.). — 14. Zbl. f. Biol. 1921, 84, S. 280.