Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Königs-
berg i. Pr.

**Ueber antibakteriolytische (antagonistische)
Substanzen normaler Sera.**

Von **R. Pfeiffer** und **E. Friedberger**.

Es ist in der Immunitätslehre heute die Tatsache wohl allgemein anerkannt, daß die bei der Immunisierung im Serum auftretenden spezifischen Stoffe (Bakteriolysine, Agglutinine, Hämolysine etc.) der Mehrzahl nach bereits im Normalserum, wenn auch in geringen Mengen, präformiert und nachweisbar sind.

Nachdem es uns gelungen war, durch Vorbehandlung mit Choleraimmunserum spezifische Antiambozeptoren zu erzeugen, war nach dem Gesagten der Gedanke naheliegend, auch im normalen Serum nach derartigen Körpern zu fahnden. Allerdings war anzunehmen, daß der Nachweis derartiger Antiambozeptoren im Normalserum von vornherein gewissen Schwierigkeiten begegnen würde. Es enthält ja jedes Normalserum, wie der eine von uns (R. Pfeiffer) schon 1896 nachgewiesen hat, stets nicht unbeträchtliche Mengen bakteriolytisch wirkender

Ambozeptoren. Die Existenz freier Auto-Antiambozeptoren im Serum war durch diese Tatsache widerlegt; aber nicht die Möglichkeit des Vorkommens von Heteroantiambozeptoren. Diese mußten jedoch, wenn ihre Menge nicht sehr erheblich war, im Tierversuch durch die neben ihnen vorhandenen Ambozeptoren verdeckt werden.

Die einzige Methode, um den hier in Frage kommenden Schwierigkeiten zu begegnen, schien uns darin gegeben zu sein, durch Zusatz von Bakterien zum normalen Serum die störenden Ambozeptoren zu verankern; nach Entfernung der mit den Ambozeptoren beladenen Bakterien mußte die vermutete Antiambozeptorwirkung des Normalserums zutage treten.

Wir stellten unsere Versuche zur Entscheidung der aufgeworfenen Fragen im wesentlichen mit Cholera-vibrionen, daneben aber auch mit Typhusbakterien an; diese beiden Bakterienspezies schienen uns mit Rücksicht darauf, daß sie ein genaues quantitatives Arbeiten ermöglichen, besonders geeignet.

Wir gingen im allgemeinen so vor, daß wir Normalsera mit abgemessenen Mengen der betreffenden Bakterienspezies (etwa 1 Oese pro ccm) emulsionierten, und nach einiger Zeit die Bakterien durch geeignete Manipulationen (Zentrifugieren, Filtrieren) wieder entfernten. Es wurde nunmehr der Einfluß derartig behandelter Normalsera auf den bakteriolytischen Effekt einer genau bestimmten Anzahl von J. E. der spezifischen Sera geprüft, indem eine Mischung beider Komponenten, nachdem sie eine bestimmte Zeit lang im Kontakt gewesen war, zusammen mit der gewöhnlichen Prüfungsdosis (eine Oese) der betreffenden voll virulenten Bakterienspezies (dos. let. minima $\frac{1}{10}$ Oese) Meerschweinchen intraperitoneal injiziert wurde.

Unsere sehr zahlreichen Untersuchungen, die sich über eine Reihe von Monaten erstrecken, haben uns zu einigen für die Praxis und Theorie der Immunitätslehre, wie es scheint, bedeutsamen Schlüssen geführt.

Wir gedenken in Bälde unsere gesamten Versuche in extenso an geeigneter Stelle zu veröffentlichen. Heute beschränken wir uns nur darauf, kurz die wichtigsten Resultate, die bei unseren Untersuchungen zutage getreten sind, mitzuteilen und im Anschluß daran eine Erklärung der gefundenen Tatsachen zu geben, soweit dies nach dem jetzigen Stande der Immunitätsforschung möglich ist.

Uebersicht über die gefundenen Tatsachen.

1. Es gelingt ausnahmslos (in sehr zahlreichen Versuchen), das normale Serum von Kaninchen, Ziegen und Tauben, nicht aber das vom Meerschweinchen, durch die Ausfällung mit Cholera- oder Typhusbakterien derart zu verändern, daß es nach Entfernung der Bakterien die Fähigkeit erworben hat, im Meerschweinchenperitoneum die Bakteriolyse der Prüfungsdosis (eine Oese) der betreffenden voll virulenten Bakterien (Cholera oder Typhus), selbst bei Anwendung eines mehrfachen Multiplums einer I. E. des homologen Immunserums, zu hemmen, sodaß die Versuchstiere durch rapides Fortschreiten der Bakterienvermehrung zugrunde gehen, während die Kontrolltiere nach rascher Auflösung der Bakterien am Leben bleiben. So hemmten z. B. in unsern Versuchen 0,3, ausnahmsweise sogar schon 0,1 normalen, mit Cholera ausgefällten Kaninchenserums nach der Entfernung der Vibrionen die bakteriolytische Wirkung von zwei bis drei I.-E. Choleraimmunserums.

2. Unausgefällt zeigten dieselben Normalsera in den gleichen Dosen in keinem Falle eine derartige Wirkung.¹⁾

3. Es gelingt nicht nur, das Serum in vitro, sondern auch in vivo antibakteriolytisch zu machen. Das Serum eines Kaninchens, dem eine massive Dosis von Cholera-vibrionen intravenös injiziert worden war, zeigte bereits eine Viertelstunde nach der Injektion die hemmende Fähigkeit gegenüber Choleraambozeptoren voll ausgeprägt.

4. Die hemmende Wirkung ist eine streng spezifische. Mit Cholera-vibrionen ausgefälltes Normalserum ist nur auf Choleraambozeptoren von Einfluß, niemals auf Typhusambozeptoren, und umgekehrt.

1) Das Serum eines normalen Kaninchens vermochte allerdings unausgefällt in der mehrfach höheren Dosis von 0,9 ccm die Wirkung von zwei I.-E. Cholera-ziegen-serum in wiederholten Versuchen zu hemmen, während bei demselben Normalserum kleine Dosen diesen hemmenden Effekt nicht zeigten.

Wie außerordentlich scharf diese Spezifität ausgesprochen ist, ergibt sich aus der Tatsache, daß von einer Emulsion von relativ viel Typhusbakterien und ganz spärlichen Cholera-vibrionen in einer Mischung von normalem, mit Cholera ausgefällten Kaninchenserum und Typhusimmunserum (Multiplum von einer I.-E.) im Meerschweinchenperitoneum die in enormer Uebersahl vorhandenen Typhusbakterien aufgelöst wurden, während die Cholera-vibrionen sich ungestört vermehrten¹⁾ und den Tod des Tieres herbeiführten.

5. Die Spezifität besteht ausschließlich in bezug auf die Bakterienart, betrifft aber nicht die Tierespezies, von welcher das Hemmungsserum stammt. Es wird dies dadurch bewiesen, daß ein mit Cholera-vibrionen ausgefälltes Normalkaninchenserum nicht nur die Choleraambozeptoren des Kaninchensimmunserums, sondern auch des Ziegenimmunserums hemmt.

6. Bedeutungsvoll für unsere Auffassung über die Natur dieser Substanzen ist die Tatsache, daß das ausgefällte Normalserum des Kaninchens auch auf die Auto-Immunkörper (von demselben Tiere nach dessen nachträglicher Immunisierung gewonnen) antibakteriolytisch wirkt.

7. Es gilt für die hemmende Wirkung des ausgefällten Normalserums auf die entsprechenden Immunkörper nicht das Gesetz der Multipla, wenigstens nicht in vollem Umfang.

Bezeichnen wir die Menge des hemmenden Normalserums, welche gerade ausreicht, um eine I.-E. des Immunserums zu paralisieren als eine Hemmungseinheit (H.-E.), so vermögen x H.-E. nicht etwa x I.-E. zu paralisieren, sondern bei Anwendung höherer Multipla derartiger Gemische überwiegt wieder die Ambozeptorwirkung, sodaß Bakteriolyse eintritt.

8. Es gelingt stets, auch nach längerem Kontakt, aus einer Mischung des Hemmungsserums mit dem Immunserum die Ambozeptoren durch von neuem zugesetzte Bakterien der Mischung zu entziehen, während die abzentrifugierte Flüssigkeit in ihrer Hemmungsqualität unverändert bleibt.

Hierdurch unterscheiden sich die hemmenden Substanzen des Normalserums von den immunisatorisch erzeugten Anti-ambozeptoren, welche, wie wir nachweisen konnten, mit den Ambozeptoren des Immunserums eine feste, durch das Hinzutreten der homologen Bakterien nicht mehr zu sprengende Verbindung eingehen, bei denen auch das Gesetz der Multipla in weiterem Umfange Gültigkeit hat.

9. Das Normalserum erhält seine hemmende Eigenschaft nicht durch eine vitale Funktion der Bakterien.

a) Die Dauer des Kontaktes der Bakterien mit dem Serum ist bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen innerhalb weiter Grenzen (10 Minuten bis 24 Stunden) auf den Grad der hemmenden Wirkung ohne nachweisbaren Einfluß.

b) Die Ausfällung gelingt in gleicher Weise wie bei 37°, auch bei Temperaturen, bei denen die Lebenstätigkeit der Bakterien bedeutend herabgesetzt ist (50°, 0°).

c) Es gelingt, auch durch die Ausfällung mit Bakterien, die zuvor bei 60°, 80° und 100° abgetötet waren, ein Normalserum hemmend zu machen.

10. Beim Abzentrifugieren der Bakterien im Abguß zurückbleibende Vibrionenkörper können nicht durch Verankerung der Ambozeptoren des Immunserums eine antibakteriolytische Qualität des ausgefällten Normalserums vortäuschen.

a) Eine Kochsalzlösung, in der Bakterien emulsioniert waren, wirkt nach dem Abzentrifugieren der Bakterien nicht hemmend.

b) Es ist für den Gehalt eines ausgefällten Normalserums an Hemmungseinheiten völlig irrelevant, ob die zugesetzten Bakterien durch Zentrifugierung oder mittels Filtration durch bakteriendichte Filter entfernt werden.

11. Eventuell bei der Ausfällung des Normalserums in Lösung gegangene Bakterienleibessubstanzen sind gleichfalls nicht die Ursache der antibakteriolytischen Wirkung.

a) Auch durch vorherige $\frac{3}{4}$ stündige Erwärmung auf 58°

1) Es sei die bemerkenswerte Tatsache hervorgehoben, daß es uns gelungen ist, bei gleichzeitiger Injektion von entsprechend hemmendem Normalserum, die Dosis letalis minima für Cholera beim Meerschweinchen bis auf $\frac{1}{\infty}$ Oese herabzudrücken (Dos. let. normal $\frac{1}{10}$ Oese). Dagegen ist es uns bis jetzt noch nicht gelungen, völlig avirulent gewordene Cholera-vibrionen durch Zusatz von Hemmungsserum im Tierkörper zur Vermehrung zu bringen.

inaktiviertes Normalserum erhält durch Bakterienausfällung dieselbe hemmende Wirkung.

b) Es gelingt nicht, durch das Hinzufügen von frischem Meerschweinchenperitonealexsudat, in dem die Bakteriolyse von größeren Vibrienmengen eben abgelaufen ist, das daher an gelösten Bakterien-substanzen sehr reich ist, Normalserum antibakteriolytisch zu machen.

Wenn wir nunmehr eine Erklärung für dieses merkwürdige Phänomen suchen, so ergeben sich, da, nach dem eben Gesagten, die Mitwirkung von Bakterien, resp. deren Produkten, nicht in Frage kommt, auf Grund unserer bisherigen Theorien über die zum Zustandekommen der Bakteriolyse notwendigen Faktoren a priori zwei Möglichkeiten. Es könnte sich um normale Antiambozeptoren oder um normale Antikomplemente handeln.

Annahme I (normale Antiambozeptoren). Da das ausgefällte Normalserum nach Absatz 6 auch die Auto-Immunkörper hemmt, so ist das von vornherein sehr unwahrscheinlich. Man müßte alsdann die gezwungene Annahme machen, daß in ein und demselben Serum aufeinander passende Ambozeptoren und Antiambozeptoren nebeneinander vorhanden wären, ohne sich gegenseitig zu binden.

Daß aber Antiambozeptoren hier tatsächlich nicht in Frage kommen können, ergibt sich aus dem unter §§ 4, 5, 7 und 8 Gesagten, wo nachgewiesen wurde, daß es möglich ist, aus einer Mischung des hemmenden Serums mit Immunserum durch nachträglichen Bakterienzusatz die Ambozeptoren wieder herauszuziehen, während der Hemmungseffekt in der alten Stärke wieder zum Vorschein kommt;

ferner spricht gegen diese Annahme die Tatsache, daß das Gesetz der Multipla für unsere Hemmungskörper keine Gültigkeit besitzt.

Das Antiambozeptorserum richtet, was uns als ausschlaggebend erscheint, seine Spezifität in erster Linie gegen die Tierspezies, deren Immunserum zu seiner Erzeugung gedient hat. Beispiel: Antiambozeptorserum, gewonnen durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Ziegencholeraimmunserum, wirkt nur auf Ziegenambozeptoren, und zwar merkwürdigerweise, nicht allein auf die Cholera-, sondern auch die Typhus-Ambozeptoren dieser Tierart, während ganz im Gegensatz dazu die Hemmungskörper des Normalserums auf die Ambozeptoren aller möglichen Tierspezies einwirken, aber mit der spezifischen Beschränkung, daß mit Cholera ausgefälltes Serum immer nur Choleraambozeptoren, mit Typhus ausgefälltes immer nur Typhusambozeptoren beeinflusst.

Die hemmende Wirkung des mit Bakterien vorbehandelten Normalserums ist also nicht auf die Gegenwart normaler präformierter Antiambozeptoren zurückzuführen; so bliebe also nur noch zunächst per exclusionem die Annahme normaler Antikomplemente übrig.

Annahme II (normale Antikomplemente). Die Richtigkeit dieser Annahme vorausgesetzt, würde sich auf Grund der strengen Spezifität in der hemmenden Wirkung normaler Sera (§ 4, 5) sich uns ein zwingender und sehr eleganter Beweis für die Mehrheit der bakteriolytischen Komplemente des normalen Meerschweinchenperitoneums ergeben, da die von uns beobachteten Tatsachen nur durch spezifische Partialkomplemente für die Cholera resp. die Typhusbakteriolyse erklärbar sein würden. Es würde dies eine weitere Stütze sein, für den pluralistischen Standpunkt Ehrlichs im Gegensatz zu der dualistischen Auffassung Metschnikoffs (Mikro- und Makrocytase), und dem unitarischen im Sinne Bordet-Grubers.

Immerhin können wir uns nicht verhehlen, daß auch der Auffassung der hemmenden Stoffe des Normalserums als Antikomplemente zunächst nicht unbeträchtliche Schwierigkeiten entgegenstehen.

Unter der Annahme präformierter Antikomplemente im Normalserum, wäre es nicht recht verständlich, weshalb diese Stoffe immer erst nach einer Vorbehandlung des Serums mit den spezifischen Bakterien sich bemerkbar machen.

Ferner müßte, wenn anders die antibakteriolytische Wirkung auf Antikomplementen beruht, von einer gewissen Dosis des hemmenden Serums an — welche gerade ausreicht, um

den gesamten in Frage kommenden Komplementgehalt der Bauchhöhle des normalen Meerschweinchens zu neutralisieren — auch bei Steigerung der Ambozeptormenge die Bakteriolyse ausbleiben, weil eben keine passenden Komplemente mehr zur Verfügung stehen.

Unsere Versuche aber ergeben im Gegenteil, daß selbst mehrfache Multipla einer H.-E. gegenüber einer etwas größeren Dosis des Immunserums in der paralyisierenden Wirkung versagen.

Ein Beispiel möge das illustrieren:

0.3 mit Cholera ausgefälltes Normalkaninchen血清 hemmt den bakteriolytischen Effekt von drei I.-E. Choleraziegen血清 auf eine Oese Cholera im Meerschweinchenperitoneum, bei fünf I.-E. tritt jedoch Bakteriolyse auf, wenn auch etwas verzögert. 0.8 desselben Hemmungsserums paralisieren nicht etwa acht I.-E., sondern versagen ebenfalls fünf I.-E. gegenüber. Diese Tatsachen entscheiden zugleich gegen die Annahme einer Komplementablenkung.

Ergeben sich somit sowohl bezüglich der Auffassung der hemmenden Körper als Antiambozeptoren wie als Antikomplemente ernste Bedenken, so bleibt nur die Möglichkeit, daß wir in diesen hemmenden Substanzen des Serums auf neue, bis dahin unbekannte Körper gestoßen sind.

Ueber die Natur der hemmenden Stoffe des Normalserums vermögen wir daher zunächst noch keine bestimmte Erklärung zu geben.

Es sei nur darauf hingewiesen, daß im Normalserum auch anderweitige hemmende Stoffe, z. B. gegenüber Antitoxinen, Hämolytinen und Verdauungsfermenten, allerdings ohne vorherige Behandlung des Serums,¹⁾ aufgedeckt worden sind.

Wir möchten vorschlagen, diese hemmenden Substanzen, bis ihre Natur völlig aufgeklärt ist, allgemein als antagonistische Substanzen des Normalserums zu bezeichnen, speziell die von uns nachgewiesenen als normale Antagonisten der Bakteriolyse (bakteriolytische Antagonisten).

Eine weitere Verfolgung der hier von uns aufgedeckten Tatsachen dürfte in theoretischer und praktischer Beziehung für die richtige Wertung mancher noch unklaren Erscheinungen auf dem Gebiete der Infektion und Immunität von Bedeutung sein.

Wir behalten uns vor, hierauf in unserer ausführlichen Publikation näher einzugehen.

Doch sei hier noch kurz auf einen Punkt hingewiesen: Das Zurücktreten, resp. nahezu völlige Versagen der Bakteriolyse in den späteren Stadien einer tödlich verlaufenden Infektion könnte, außer auf den Mangel an Ambozeptoren und Komplementen, wohl auch auf die Wirkung dieser Antagonisten zu beziehen sein.