ARBEITEN AUS DEM STAATSINSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE UND DEM GEORG SPEYER-HAUSE ZU FRANKFURT A. M.

BEGRÜNDET VON PAUL EHRLICH

HERAUSGEGEBEN VON

DR. W. KOLLE

DIREKTOR DES STAATSINST. FÜR EXP. THERAPIE UND DES GEORG SPEYER-HAUSES,
O. HONORARPROFESSOR AN DER UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

Heft 13.

R. Otto und H. Hetsch, Die staatliche Prüfung der Heilsera und des Tuberkulins. Mit einer Einleitung von W. Kolle und 6 Abbildungen im Text.

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1921

Paul Ehrlich-
Institut
Bibliothek
Frankfurt a. Main

X/9 (13)

Die staatliche Prüfung der Heilsera und des Tuberkulins

Nach der im Jahre 1906 von R. Otto herausgegebenen Abhandlung „Die staatliche Prüfung der Heilsera“

ergänzt und herausgegeben

von

Prof. Dr. **R. Otto**
Geh. Med.-Rat und Abteilungsdirektor am Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ in Berlin, früher Mitgl. des Institutes für exp. Therapie

und

Prof. Dr. **H. Hetsch**
Wissenschaftliches Mitglied des Staatsinstitutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.

Mit einer Einleitung

von

Prof. Dr. **W. Kolle**
Geh. Med.-Rat und Direktor des Staatsinstitutes für experimentelle Therapie und des Georg Speyer-Hauses in Frankfurt a. M.

Mit 6 Abbildungen im Text

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung 7

Allgemeiner Teil

A. Die „staatlich geprüften" Präparate 19
B. Die Zulassung zur staatlichen Prüfung 26
C. Die örtliche Kontrolle an der Herstellungsstätte 28
D. Die Prüfung im Institut für experimentelle Therapie 32
I. Die Prüfung auf Unschädlichkeit 33
II. Die Wertbemessung 36
a) Die Wertbemessung der Antitoxine 39
b) Die Wertbemessung der antibakteriellen Sera 54

Spezieller Teil

1. Die Prüfung des Diphtherieserums 65
2. Die Prüfung des Tetanusserums 78
3. Die Prüfung des Dysenterieserums 85
4. Die Prüfung des Meningokokkenserums 90
5. Die Prüfung des Antistreptokokkenserums 99
6. Die Prüfung des Rotlaufserums 101
7. Die Prüfung des Schweineseucheserums 105
8. Die Prüfung des Geflügelcholeraserums 107
9. Die Prüfung des Tuberkulins 107

Literaturverzeichnis 110

Einleitung.

In diesem Monat sind 25 Jahre verflossen, seit für die staatliche Prüfung des Diphtherieserums eine staatliche Anstalt, das „Institut für Serumforschung und Serumprüfung“ in Steglitz bei Berlin errichtet wurde, das 3 Jahre später als „Institut für experimentelle Therapie“ nach Frankfurt a. M. verlegt wurde.

E. v. Behring hatte in grundlegenden Arbeiten während der Jahre 1889—1891 bei ausgedehnten Tierversuchen die Entdeckung gemacht, daß die Diphtherieimmunität durch die Gegengifte des von Löffler entdeckten Diphtherietoxins, des Sekretionsproduktes des Löfflerschen Bazillus, bedingt ist. Er gelangte logischerweise dazu, die von ihm im Blute von diphtherieimmunen Tieren entdeckten Antitoxine zur Heilung der Diphtherieerkrankung des Menschen zu empfehlen, nachdem er die Möglichkeit der Heilung von diphtherievergifteten und diphtherieinfizierten Tieren gezeigt hatte. Schon bei den ersten Versuchen der Immunisierung größerer Tiere hatte sich herausgestellt, wie notwendig die Auffindung von Methoden war, um den Gehalt des Blutserums, z. B. von Pferden, an Antitoxin genau festzustellen. Denn die Hochtreibung der Immunität, die Anreicherung der Antitoxine im Blutserum immunisierter Tiere gestaltete sich schwierig, da hier sehr komplizierte Vorgänge eintreten können. Es sei nur an die Ueberempfindlichkeitserscheinungen erinnert, die sich im Laufe der Immunisierung nicht selten einstellen und eine Gewinnung hochwertiger Sera bei Pferden erschweren. Die Ursachen für die Schwierigkeiten waren, abgesehen von der Gewinnung starker, konstanter und in ihrer Giftwirkung meßbarer Gifte, darin begründet, daß die chemischen und biochemischen Eigenschaften und die Zusammensetzung des Diphtheriegiftes noch unbekannt waren und genauere Kenntnisse der Gesetzmäßigkeit der Gewinnung hochwertiger Sera, der Methoden der Antitoxinanreicherung usw. fehlten. v. Behring und seine Mitarbeiter Wernicke und Knorr erkannten die Notwendigkeit, exakte Methoden der Wertbestimmung von Giften und Gegengiften zu suchen. Das gleiche Verhalten stellte sich auch beim Tetanustoxin und dessen von v. Behring entdeckten Gegen-

gift, dem Tetanusantitoxin, heraus, wie die Untersuchungen von v. Behring, Kitasato und Knorr gezeigt hatten.

In diesem Zeitabschnitt wurden die Arbeiten von Paul Ehrlich über die dem Diphtheriegift ähnlichen Pflanzengifte Rizin, Abrin und Robin für die Lösung der Immunisierungsprobleme und die Ausschaltung der Schwierigkeiten bei der Gewinnung hochwertiger Sera an größeren Tieren von Wichtigkeit. Ehrlich begann 1893 seine Studien mit Diphtheriegift und Diphtherieantitoxinen in Verfolgung seiner Untersuchungen über das Antirizin, Antiabrin und Antirobin, die Antitoxine der genannten pflanzlichen Toxine. Hierbei hatte sich ergeben, daß genau und zahlenmäßig zu berechnende Beziehungen zwischen dem Rizin und Antirizin, Abrin und Antiabrin usw. bestehen. v. Behring und Ehrlich vereinigten sich nun zu gemeinsamer Arbeit und stellten auf Grund der Tierversuche von Ehrlich, der zuerst zahlenmäßig die Wirksamkeit der Antitoxine berechnete, den Begriff der Antitoxin- bzw. Immunitätseinheit auf. Diese in der Prüfungstechnik benutzte Einheit (IE. oder AE.) ist eine willkürliche Größe und so entstanden, daß Ehrlich eine bestimmte, an sich beliebige Menge Antitoxin als Einheit bezeichnete, die von einem damals zur Verfügung stehenden Gift 100 tödliche Dosen so absättigte, daß nach Injektion dieses Gemisches auch nicht die geringste Spur von Krankheit (lokaler und allgemeiner Reaktion) eintrat.

Paul Ehrlich führte in den Jahren 1893—1897 die geradezu klassischen Untersuchungen der Wertbestimmung der antitoxischen Sera, namentlich des Diphtherie- und Tetanusserums aus. Diese Methoden sind auf der ganzen Welt angenommen und eingeführt. Denn es hatte sich bei der klinischen Erprobung des Diphtherieserums inzwischen herausgestellt, daß für die Heilung der menschlichen Diphtherie eine bestimmte Menge von Immunitätseinheiten des Diphtherieserums dem Kranken zugeführt werden muß. Ganz wie beim experimentell krankgemachten Tier, wo — wie die weitergeführten Versuche ergeben hatten — der Heil- und Immunisierungswert dem Gehalt an Antitoxineinheiten parallel geht. Die ersten klinischen, mit dem Diphtherieheilserum angestellten Versuche fielen deshalb nicht so günstig aus, wie auf Grund der Tierversuche zu erwarten war, weil nicht die genügenden Mengen von Antitoxineinheiten zugeführt wurden. Zum Teil lag es daran, daß man in der Immunisierung größerer Tiere noch keine genügenden Erfahrungen hatte und daher Sera, die 300—400 AE. im Kubikzentimeter enthielten, noch nicht besaß, anderenteils aber daran, daß die genauen Wertbestimmungsmethoden für den Gehalt des Diphtherieserums an Antitoxin fehlten. Auch in England und Dänemark war die neue Behringsche Serumtherapie aus dem gleichen Grunde anfangs nicht günstig aufgenommen worden. Als aber die englischen und dänischen Sera mit dem Ehrlichschen Standardserum

vergleichsweise geprüft wurden, stellte sich heraus, daß ihre mangelhafte Wirkung in dem zu geringen Antitoxingehalt begründet war.

Die Grundlage der Wertbestimmung war der Besitz eines unveränderlichen Maßstabes, einer Eichungsgröße, die unter genau zu formulierenden Bedingungen konstant bleibt, wie das Normalmetermaß in genau zahlenmäßiger Weise festgelegt und kontrolliert werden kann. Ehrlich fand, daß die Toxine und Antitoxine sich in flüssigem Zustande verändern, und zwar in dem Sinne, daß sie schwächer wirksam werden. Diese Abschwächung erfolgt bei Toxinen und Antitoxinen zuweilen zeitlich in annähernd gleichem Grade, so daß bei Prüfung gleichaltriger Toxine und Antitoxine die Abschwächung nicht erkannt wird.

Wie in der nachstehenden Abhandlung von Otto und Hetsch auseinandergesetzt wird, erfolgt im Institut für experimentelle Therapie die Aufbewahrung der „Standardsera“ in absolut trockenem Zustande in maximal evakuierten Röhrchen. Die Standardsera sind noch haltbarer als die Gifte und dienen deshalb als Grundlage der staatlichen Wertbestimmung des Diphtherie- und Tetanusserums. Diese wurde auf Grund der Beschlüsse einer im Reichsgesundheitsamt zusammenberufenen Konferenz festgelegt, die der Einführung der staatlichen Kontrolle der für den Handel bestimmten Serumpräparate gegenüber einer Verstaatlichung der Serumherstellung den Vorzug gab. Um das Publikum gegen die Behandlung mit minderwertigen oder nicht einwandfreien Serumpräparaten zu schützen, wurde durch Kaiserliche Verordnung vom 31. Dezember 1894 das Diphtherieserum dem freien Verkehr entzogen und in die Reihe derjenigen Arzneistoffe aufgenommen, die nach der Verordnung vom 27. Januar 1890, betreffend den Verkehr mit Arzneimitteln, nicht außerhalb der Apotheken feilgehalten und verkauft werden dürfen. Durch die Einführung der staatlichen Kontrolle der Sera wurde außerdem noch der Zweck erreicht, eine richtige Beurteilung der Erfolge der Serumtherapie zu ermöglichen. Die Gewinnung eines Urteils über die Erfolge der neuen Behandlungsmethode der Diphtherie wäre den Klinikern erschwert worden, wenn ihnen nicht durch Anwendung der staatlich geprüften Sera die Injektion genau dosierter Mengen der Antitoxine ermöglicht worden wäre. Auch die Unschädlichkeit der Sera (Sterilität und Freisein von Giften) mußte durch die staatliche Kontrolle gewährleistet werden.

Die staatliche Prüfung des Diphtherieserums wurde am 20. Februar 1895 dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin, dessen Direktor damals Robert Koch war, übertragen und dort in der „Kontrollstation für Diphtherieheilsera“ ausgeführt. Am 20. Juni 1896 wurde diese Kontrollstation zu einem selbständigen Institut, dem „Institut für Serumforschung und Serumprüfung“ erweitert. Die Leitung des neuen, in Mietsräumen in

Steglitz errichteten Instituts erhielt Professor Dr. Paul Ehrlich, der hier für sich und die Mitglieder des Instituts eine Arbeitsstätte zur weiteren Erforschung der durch die Behringsche Serumtherapie gegebenen Probleme erhielt. Die dem Institut neben der Organisation der staatlichen Prüfung und deren Ueberwachung zufallenden Aufgaben praktischer und wissenschaftlicher Natur erweiterten sich so rasch, daß eine Vergrößerung notwendig wurde. Es wurde deshalb auf die Initiative des damaligen Vortragenden Rates im Preußischen Kultusministerium Professor Dr. Althoff unter Mitwirkung der damaligen Vortragenden Räte F. Schmidt und M. Kirchner sowie des Oberbürgermeisters der Stadt Frankfurt a. M. Adickes das Institut für Serumforschung und Serumprüfung als „Institut für experimentelle Therapie" nach Frankfurt a. M. verlegt. Im November 1899 fand in Gegenwart von Vertretern der staatlichen und städtischen Behörden die feierliche Eröffnung des Instituts statt, das der damalige Kultusminister Bosse selbst seiner Bestimmung übergab.

Das Institut für experimentelle Therapie ist die staatliche Prüfungsstelle für alle Serumpräparate und Impfstoffe, deren Prüfung amtlich vorgeschrieben ist. Die Prüfung bezieht sich auf Keimfreiheit, Eiweißgehalt, Unschädlichkeit (Phenolgehalt, Freiheit von Tetanussporen und -gift) und auf den Gehalt an wirksamen Stoffen. Im Laufe der Zeit hat sich die Zahl der prüfungspflichtigen Sera, zu denen anfangs nur Diphtherie- und Tetanusserum gehörten, vermehrt. Das Rotlaufserum wurde 1899, das Meningokokkenserum 1915 prüfungspflichtig. Von Impfstoffen ist bisher nur das Kochsche Alttuberkulin prüfungspflichtig. Seit dem 1. Januar 1921 ist dem Institut auch die amtliche Prüfung der Reagentien für die Ausführung der Wassermannschen Reaktion übertragen, nachdem eine Bundesratsverordnung über diesen Gegenstand Gesetzeskraft erhalten hat. Auf Grund dieser Verordnung müssen alle für öffentliche Zwecke und für dritte Personen ausgeführten serodiagnostischen Untersuchungen auf Syphilis (Wassermannsche Reaktion) mit staatlich geprüften Extrakten und Ambozeptoren ausgeführt werden.

Neben der obligatorischen Prüfung der staatlich prüfungspflichtig gemachten Sera werden im Institut für experimentelle Therapie zur Prüfung auch solche Sera zugelassen, bei denen die Prüfung fakultativ ist, d. h. von den betreffenden Fabriken selbst veranlaßt und beantragt wird, um eine Gewähr für die Unschädlichkeit und den Gehalt an Stoffen zu bieten, die für das betreffende Serum als therapeutisch wertvoll gelten. Es handelt sich hier in erster Linie um das Streptokokkenserum und Dysenterieserum, ferner um einige Sera für die Veterinärmedizin: Schweineseuche- und Geflügelcholeraserum.

Die für die Prüfung notwendigen Standardgifte und -sera werden vom Institut auch an die Fabriken, die die Prüfung vornehmen lassen,

zur eigenen Kontrolle ihrer Fabrikation abgegeben. Auf den regelmäßigen Bezug von Diphtheriestandardserum sind auch fast alle namhaften europäischen und außereuropäischen staatlichen und privaten, der Gewinnung von Schutz- und Heilseren dienenden Institute abonniert. Vor dem Kriege waren es 56 ausländische Institute, die sich auf Oesterreich-Ungarn, die Schweiz, Italien, Spanien, Portugal, Rußland, die Türkei, Bulgarien, Rumänien, England, die Niederlande, Frankreich, Belgien, Dänemark, Norwegen, Schweden, Nord- und Südamerika, Kuba, Indien und Japan verteilten. Es ist anzunehmen, daß diese durch den Krieg unterbrochenen Beziehungen bald wieder angeknüpft werden, soweit sie nicht jetzt schon wieder aufgenommen worden sind. Durch die bei Verwendung gleicher Standardpräparate erzielte Einheitlichkeit ist in der wissenschaftlichen Beurteilung der Erfolge der Serumtherapie viel gewonnen.

Zur Durchführung der Kontrolle werden Proben aller geprüften Sera im Institut aufbewahrt und nach bestimmten Zeiträumen auf Grund der Listen und der Bücher, aus denen die ursprüngliche Wertigkeit zu ersehen ist, nachgeprüft. Von dem Ergebnis der Nachprüfung werden die zuständigen Amtsstellen benachrichtigt, wenn eine solche Abschwächung des Gehaltes an wirksamen Stoffen erfolgt ist, daß die Sera eingezogen werden müssen.

Zur Durchführung aller dieser prüfungstechnischen Aufgaben sind seit dem Bestehen des Instituts zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten über die zuverlässigsten Methoden der Wertbestimmung der einzelnen Sera ausgeführt und die damit in engem Zusammenhang stehenden theoretischen Fragen über die Wirkung der Antikörper in vitro und in vivo eingehend untersucht worden. Viele dieser Untersuchungen haben praktische Ergebnisse gehabt. So waren z. B. die Arbeiten von Dönitz über die Wertbestimmung des Tuberkulins im Anschluß an die Kochschen Angaben über die Wirkung der Tuberkulinpräparate maßgebend für die Prüfung des Tuberkulins mit Hilfe eines Standardtuberkulins, das im Institut aufbewahrt wird. Die Arbeiten von Marx über Rotlaufserum haben Aufschluß gegeben nicht nur über die beste Methode der Wertbestimmung, sondern auch über die Wirkung des Rotlaufserums gegenüber der gleichzeitig oder später injizierten Kultur. Hierbei konnte Marx das von Ehrlich für die Prüfung der Antitoxine eingeführte Prinzip der Heranziehung eines „Standardserums" erfolgreich verwenden, um bei der schwankenden Virulenz der Kulturen eine feste Vergleichsskala für das zu prüfende Serum zu erzielen.

Studien über das Dysenterietoxin und -antitoxin führten dann in weiterer Verfolgung dieser Arbeiten zu der Erkenntnis, daß die Verimpfung der Toxin-Antitoxingemische auf weiße Mäuse auch für die Wertbemessung des Dysenterieserums die zuverlässigste Prüfungsmethode darstellt. Im Anschluß an frühere Versuche von Kolle,

Heller und de Mestral, bei denen die Gemische intraperitoneal injiziert wurden, haben H. Sachs und Georgi gezeigt, daß die intravenöse Einverleibung noch regelmäßigere Versuchsreihen ergibt. Auf Grund dieser Erfahrungen ist das während des Krieges im Heer obligatorisch eingeführte und jetzt allgemein zugelassene Verfahren der Dysenterieserumprüfung ausgearbeitet.

Für die Prüfung der antiinfektiösen Sera kommt in erster Linie der Tierversuch in Frage. Am bekanntesten ist die Methode der Titration der Bakteriolysine R. Pfeiffers, die in allen antiinfektiösen Seris sicher in mehr oder weniger großem Umfange vorhanden sind, mittels des Pfeifferschen Versuches geworden. Da aber die Versuchsanordnung R. Pfeiffers bei manchen antiinfektiösen Seris nicht zum Ziele führt, so war es ein Fortschritt, als M. Neisser und Wechsberg in Fortsetzung von Versuchen von M. Laubenheimer, Stern und Korte sowie M. Hahn in der Plattenkultur eine brauchbare und einfache Methode fanden, um die Menge der in vitro durch bakterizide Sera abgetöteten Keime zu bestimmen. Das Neisser-Wechsbergsche Verfahren ergibt durchaus sichere Resultate, wenn es auch bisher für praktische Prüfungszwecke keine Verwendung gefunden hat.

Besondere Bedeutung haben die Untersuchungen von R. Otto über das von ihm nach Theobald Smith benannte Phänomen erlangt. Theobald Smith hatte beobachtet, daß Meerschweinchen, denen Diphtherietoxin-Antitoxingemische injiziert waren, bei der nach einigen Monaten erfolgenden Injektion von Diphtherieserum akut schwer erkrankten bzw. starben. Otto konnte bei seinen im Institut angestellten Studien eine Analyse des Phänomens erbringen, indem er zeigte, daß sich durch Serum bei Meerschweinchen die höchsten Grade von Anaphylaxie erzielen lassen; er fand dabei u. a., daß die Anaphylaxie erzeugenden Stoffe sich auf gesunde Tiere übertragen lassen. Diese Beobachtungen haben die Anaphylaxieforschung gefördert und angeregt und somit zum Studium der Nebenwirkungen des Diphtherieserums und deren Vermeidung beigetragen, wenngleich man ja schon auf Grund klinischer Beobachtungen zu der Erkenntnis gelangt war, daß die Nebenwirkungen der Serumtherapie, Serumexantheme, Fieber und Eiweiß, Gelenkschwellungen, nicht auf dem Antitoxingehalt, sondern auf Stoffen des normalen Pferdeserums bzw. den von ihnen im Körper des Injizierten ausgelösten Reaktionen beruhen. Die Erkenntnis, daß diese Stoffe mit den Eiweißkörpern in Zusammenhang stehen, ist für die Einführung der hochwertigen Sera bestimmend gewesen, weil bei ihnen in möglichst geringen Serummengen möglichst viel Antitoxine einverleibt werden können.

Wie aus der die Einzelheiten der Prüfungstechnik der verschiedenen Sera darstellenden Abhandlung von Otto und Hetsch hervorgeht, sind bei der Prüfung der Serumpräparate viele Fragen der kleinen

Laboratoriumstechnik und die verschiedenartigsten Handgriffe, die sich auch auf die Gewinnung der Gifte, Herstellung der Lösungen und Mischungen, die Art der Injektion usw. beziehen, von Bedeutung für die Gleichmäßigkeit der Prüfungsresultate. Mit Ausnahme des Meningokokkenserums, bei dem der Gehalt an Bakteriotropinen nach Neufelds Methode und an komplementbindenden Stoffe nach Kolle und Wassermann mittels Regenzglasversuchen festgestellt wird, wird die Wertbestimmung aller Sera und des Tuberkulins durch Tierversuchsreihen durchgeführt. Neben der Auswahl geeigneter Tiere spielt Uebung und Sicherheit in den Handgriffen und die Pflege der Versuchstiere eine große Rolle. Es werden dann in der Hand des Geübten sichere Resultate erzielt. Bei geringsten Differenzen im Ausfall der Versuche kann auf Versehen geschlossen werden, die auch dem Geübten unterlaufen können. Dann muß eine Wiederholung stattfinden, um eine Gewähr für die Richtigkeit zu haben. Große Bedeutung besitzt auch die Technik der Herstellung der Verdünnungen, um einen gleichmäßigen Prüfungsbetrieb zu gewährleisten. Hierbei spielen die feinen Pipetten, die die absolut genaue Abmessung kleinster Mengen gestatten, und vielerlei sonstige Vorsichtsmaßregeln eine Rolle. Es ist z. B. nicht gleichgültig, ob man die Pipette auslaufen läßt oder ausbläst. Ferner verdienen die genaue Einhaltung der Zeit, die die Mischungen stehen müssen, und die Temperatur, bei der sie gehalten werden, Beachtung. Alle diese Beobachtungen, die auf einer 25-jährigen Erfahrung im Prüfungsbetrieb beruhen und im Institut durch Ehrlich selbst, Dönitz, Marx, Otto, Berghaus, Boehncke, H. Sachs und Hetsch sowie durch Verfasser gesammelt wurden, sind bei der Beschreibung der Methoden verwertet worden. Bei der technischen Durchführung der Prüfung ist seit Gründung des Instituts der Präparator Göldner tätig gewesen.

In engem Zusammenhange mit der Frage der Wertbestimmung des Diphtherieserums sind einige wissenschaftliche Streitfragen größeren Umfanges im Lauf der Zeit vom Institut bearbeitet worden, die sich vor allen Dingen an die Angriffe knüpfen, die von Arrhenius und Kraus gegen die theoretischen Grundlagen oder die praktische Ausführung der Wertbestimmung des Diphtherieserums und in neuerer Zeit von Bingel gegen die Wirksamkeit dieses Antitoxins bei der Behandlung der menschlichen Diphtherie unternommen wurden.

Entgegen der Annahme Ehrlichs, daß Diphtherietoxin und Antitoxin sich wie bei manchen chemischen Prozessen nach dem Muster einer starken Säure und Base vereinigen, wobei ein Molekül Gift stets die gleiche Menge Antitoxin bindet, kamen Arrhenius und Madsen auf Grund ihrer Studien über Tetanolysin und Antitetanolysin zu dem Schluß, daß sich hier die Absättigungskurve fast analog verhält wie bei der Vereinigung von Ammoniak und Borsäure, also einer schwachen Säure und schwachen Base. Wenn diese Annahme richtig wäre, würde

sich die Beziehung von Toxin und Antitoxin nicht nach dem Gesetz der konstanten Proportionen, sondern nach dem GULDBERG-WAAGEschen Gesetz der Massen regeln. Der Unterschied dieser Auffassung hat nicht nur theoretisches, sondern auch praktisches Interesse, denn in dem von ARRHENIUS und MADSEN angenommenen Falle würden die nach EHRLICH als selbständig neben dem Toxin bestehenden Stoffe des Diphtheriegiftes, die sogenannten Toxoide, nur unabgesättigte dissoziierte Toxinmoleküle und keine von diesen verschiedene Substanzen sein.

Des näheren auf die von EHRLICH und seinen Mitarbeitern H. SACHS und v. DUNGERN sowie von physikalischer Seite zur Widerlegung der ARRHENIUS-MADSENschen Lehre angestellten sehr komplizierten Versuche näher einzugehen, würde hier zu weit führen. Diese Versuche, die zur Stütze der für die Wertbestimmung des Diphtherieserums grundlegenden Methoden und der Verwendung alter abgelagerter Gifte, zur Ermittlung der Prüfungsdosis des Giftes sowie der darauf abgestimmten Serummengen dann technisch notwendig waren, haben ergeben, daß diese antitoxinbindenden Toxoide als besondere Stoffe tatsächlich vorhanden sind. Es konnte ferner gezeigt werden, daß die Festigkeit der Bindung von Toxin-Antitoxingemischen von der Zeitdauer der Einwirkung beider Komponenten abhängig ist. Die Bindung ist anfangs sehr locker, nimmt aber allmählich an Festigkeit zu, so daß sie nach einer gewissen Zeit überhaupt nicht mehr gesprengt werden kann.

Diese Versuche zeigen, wie genau die von EHRLICH und seinen Mitarbeitern aufgestellten Vorschriften für die Gewinnung von Testtoxinen maßgebend sind, und liefern weitere Beweise, wie notwendig es ist, neben den Testgiften auch Standardsera vorrätig zu halten, mit denen jederzeit die Konstanz der Maßstäbe kontrolliert werden kann.

Die Angriffe von R. KRAUS richteten sich gegen den Wert der EHRLICHschen Mischungsmethode für die Bestimmung des Antitoxingehaltes bzw. die Bedeutung der so ermittelten Antitoxinwerte für die Beurteilung des Heilwertes der antitoxischen Sera. KRAUS und SCHWONER stellten Versuche an, um zu beweisen, daß die Hochwertigkeit der Sera, bezogen auf den Antitoxingehalt, kein Maßstab ist für die Heilkraft im Tierversuch, d. h. wenn die Sera nach der Vergiftung bzw. nach der Infektion mit lebenden Diphtheriebazillen angewandt werden. Diese Angaben von KRAUS und SCHWONER sind durch Versuche, die unter EHRLICHS Leitung von BERGHAUS und BOEHNCKE sowie in neuerer Zeit von KOLLE und SCHLOSSBERGER durchgeführt sind, als nicht zutreffend erkannt. Es hat sich nicht nur gezeigt, daß — wie BERGHAUS und auch andere fanden — die Heilkraft des nach der Intoxikation einverleibten Serums um so stärker ist, je mehr Antitoxineinheiten es enthält, sondern daß auch bei mit lebenden Diphtheriebazillen infizierten

Meerschweinchen und Mäusen die Heilwirkung durch hoch- und niedrigwertige Sera immer dem Antitoxingehalt parallel geht.

In engstem Zusammenhange mit den Methoden der Wertbestimmung der Sera und deren Bedeutung für die Verwendung der mit Toxinen oder Bakterien gewonnenen therapeutischen Sera stehen die Arbeiten von EHRLICH und seinen Mitarbeitern WASSERMANN, DÖNITZ, MARX, M. NEISSER, MORGENROTH, H. SACHS über die EHRLICHsche Seitenkettentheorie. In glücklichster Weise hatten EHRLICH bei Aufstellung seiner Theorie Ideen geleitet, in denen er strukturchemische Vorstellungen mit den biologischen verknüpfte. Indem er an die WEIGERTschen Regenerationsgesetze anknüpfte und die Antikörper nach Analogie der Regenerationsvorgänge als Reaktionsprodukte des Organismus und der Zellen, an die die Bakteriengifte gebunden werden, erklärte, kam er zu der heuristisch so wertvollen Theorie. Diese gab nicht nur für die Gewinnung hochwertiger antitoxischer und antiinfektiöser Sera eine leicht faßliche Erklärung, sondern war auch für alle praktischen immunitätstechnischen Arbeiten, so z. B. für die Wertbestimmung der Sera, die Bindungsgesetze von Toxin und Antitoxin und die Beurteilung der Heilversuche mit Serum von großer Bedeutung. Auch v. BEHRING erkannte die Bedeutung der strukturchemischen Vorstellung, die Einführung der haptophoren Gruppen und Rezeptoren in die Immunitätslehre und den Vergleich EHRLICHS mit den Assimilations- und Regenerationsgesetzen an, indem er sagte: „Dieselbe Substanz im lebenden Körper, welche, in der Zelle gelegen, Voraussetzung und Bedingung einer Vergiftung ist, wird Ursache der Heilung, wenn sie sich in der Blutflüssigkeit befindet.“ Die Bindung von Antigenen an Antikörper und Körperzellen beruht in letzter Instanz eben — dafür ist die Seitenkettentheorie eine leicht faßliche und in formelähnlichen Zeichen ausdrückbare Theorie — auf chemischen Atomgruppierungen, so daß die Brücke zwischen den chemischen und biochemischen Vorgängen der Zellularphysiologie geschlagen ist. Die neuerdings vielfach vertretene Richtung, die neben den strukturchemischen Vorstellungen der Seitenkettentheorie auch die physikalische Wirkung der Reaktionsprodukte bzw. die physikalischen Veränderungen der Zellen und Körperflüssigkeiten ins Auge faßt, kann die Grundlagen der Seitenkettentheorie bis auf weiteres nicht erschüttern. Der feste Boden, auf dem diese Vorstellungen beruhen, zeigt sich gerade bei den Wertbestimmungsmethoden. Es verlohnt sich wohl, die Frage aufzuwerfen, wo wir auf Grund der jetzigen Kenntnisse der Kolloidchemie über die physikalisch-chemischen Vorgänge im Serum die Grundlagen finden sollen, um quantitativ mit der Genauigkeit zu arbeiten, wie es die strukturchemischen Auffassungen in der Serologie ermöglicht haben. Bei der Heilung von toxinvergifteten Tieren mittels Antitoxinen nach quantitativ verlaufenden Regeln ist der Körper nicht

— wie SAHLI sagt — „ein Spielball seiner Kolloide", sondern den biochemischen Gesetzen quantitativ und berechenbar unterworfen. Das findet seinen Ausdruck in EHRLICHS Theorie. Weder praktisch noch heuristisch ist die neue SAHLische Theorie, die im Sinne der kolloidchemischen Vorstellung die Vorgänge der Heilung statt in die Zellen in das Blut und das kolloidale Gleichgewicht des Blutes, des „Exkretionsproduktes der Körperzellen", verlegt, bis jetzt irgendwie brauchbar. Sie bringt an sich überhaupt nichts Neues, sondern höchstens eine Ergänzung der EHRLICHschen Vorstellung über die Bildung von Antigenen und Antikörpern in Anlehnung an die Assimilations- und Regenerationsprozesse in den Zellen. SAHLI setzt an die Stelle der auf die Zellen wirkenden Zellreize (Rezeptorbesetzung) die von der Schwankung der Blutkolloide ausgehenden. Die Erhaltung des „Blutkolloidspiegels" (nach Analogie des Blutzuckerspiegels) kann ja tatsächlich in letzter Instanz nur durch Reize auf die Zellvorgänge erfolgen. Aber wie diese Wirkung durch Reize nach der Kolloidchemie zu erklären ist, das gibt SAHLI nicht an und beweist er auch experimentell nicht. Wir wissen über derartige auf kolloidalen Vorgängen durch „Absenkung des Spiegels" beruhende Reize noch nichts, während EHRLICHS Theorie den Reiz auf die Zelle als Folge des Eindringens der reizenden Substanz (des Giftes, das an die Rezeptoren der Zelle verankert wird) biologisch verständlich und für Experimente verwertbar macht. Auch heuristisch ist die SAHLische Theorie nicht zu verwenden im Gegensatz zur EHRLICHschen, die bei der Erforschung der serologischen Probleme Wertvolles geleistet hat. EHRLICHS Theorie ist auch in ihrer bildlich-schematischen Darstellungsweise der Immunitätsvorgänge unentbehrlich.

Der Wert genauer Methoden für die Wertbestimmung der Sera hat sich auch bei der erneut durch A. BINGEL aufgeworfenen Frage über die Heilkraft des Diphtherieserums im Vergleich zu der des normalen Pferdeserums gezeigt. Nach der Behauptung dieses Autors soll das normale Pferdeserum bei der Behandlung der Diphtherieerkrankung zahlenmäßig gleich gute Resultate ergeben, wie das antitoxische Diphtherieserum.

Von klinischer Seite haben die Angaben BINGELS schon eine überzeugende Widerlegung erfahren, auf die hier nicht eingegangen werden soll. Sie haben aber Veranlassung gegeben, gewisse Einwände, die der experimentellen Begründung der Serumtherapie gemacht werden konnten und von Bedeutung für die weitere Verfolgung der BINGELschen Ideen hätten werden können, erneut einer experimentellen Prüfung zu unterziehen. Einer dieser Einwände war der, daß die Schutz- und Heilwirkung des Diphtherieserums fast nur mit einem einzigen Stamme, jedenfalls nicht in größeren Versuchsreihen mit verschiedenartigsten Diphtheriestämmen geprüft wurde, und daß bei den Tierheilversuchen Diphtheriegift, nicht lebende Bazillen, zur Erzeugung der tödlichen

Krankheit verwandt wurde. Diese Lücke wurde von KOLLE und SCHLOSSBERGER durch umfangreiche Versuchsreihen unter Verwendung einer größeren Anzahl verschiedener, zum Teil aus frischem Diphtheriematerial reingezüchteter, stark tierpathogener Diphtheriestämme ausgefüllt.

Bei diesen im Institut für experimentelle Therapie angestellten Versuchen ergab sich, daß die Wirksamkeit des Serums auch bei Verwendung heterogener Gifte und bei Tieren, die mit lebenden Bakterien infiziert und vergiftet wurden, dem nach der Mischungsmethode bestimmten Antitoxingehalte parallel geht und um so stärker und sicherer ist, je früher nach der Injektion des Giftes die Anwendung des Heilserums erfolgt. Es war auch möglich, unter genauer Benutzung der Wertbestimmungsmethoden mit lebenden Diphtheriebazillen an Pferden hergestellte Sera auf ihre Heilkraft gegenüber zahlreichen heterologen Toxinen, die im Reagenzglase von den Diphtheriebazillen gebildet waren und zur Vergiftung der Tiere führten, zu prüfen. Solche Sera besitzen Schutz- und Heilkraft bei den mit lebenden Bakterien subkutan, perkutan oder intraperitoneal infizierten oder mit Diphtherietoxin vergifteten Meerschweinchen und Kaninchen. Ihre prophylaktische bzw. therapeutische Wirkung geht dem nach EHRLICHS Methode bestimmten Antitoxingehalt, nicht der absoluten Menge des Serums, parallel. Eine Ueberlegenheit des mit lebenden Diphtheriebazillen bei Pferden gewonnen Diphtherieserums gegenüber den mittels Reagenzglasgiften hergestellten kann im Tierversuch nicht festgestellt werden. Auch diese Tatsache spricht gegen die Annahme, daß im Tierkörper andere Gifte von den Diphtheriebazillen erzeugt werden als im Reagenzglase. Die sichere Schutzwirkung des mit Reagenzglasgiften hergestellten Diphtherieantitoxins beim Menschen bildet das Schlußglied in der Beweiskette, daß nur der Antitoxingehalt des Serums maßgebend für die Schutz- und Heilwirkung bei der menschlichen Diphtherie, die eine Toxinvergiftung ist, sein kann.

Das Diphtherieantitoxin wirkt also heilend durch die direkte Neutralisierung der von den Diphtheriebazillen im Reagenzglase oder im Tier- bzw. im Menschenkörper gebildeten Gifte. Diese Giftneutralisierung verläuft, wie der Tierversuch zeigt, genau nach quantitativen Gesetzen durch Bindung von Toxin und Antitoxin, analog der Vereinigung einer Säure mit einer Base (KOLLE, JOSEPH und SCHLOSSBERGER). Im Diphtherieserum werden dem Körper fertige, direkt das Gift neutralisierende und damit die Diphtheriebakterien entgiftende Stoffe einverleibt, die fortlaufend die im Blut und in den Säften kreisenden Toxine abfangen und ihrer Giftwirkung berauben.

Im Gegensatz zum antitoxischen Serum entfaltet das normale antitoxinfreie Pferdeserum zwar eine gewisse Wirkung auf den Verlauf der Diphtherieerkrankung des Meerschweinchens, die sich manchmal in

einer Verzögerung des Todes, zuweilen auch in einer Ausheilung des Prozesses kundgibt, sie tritt aber nur bei der Infektion mit wenig virulenter Kultur und bei Injektion größter Serumdosen kurze Zeit nach der Infektion in Erscheinung. Bei Meerschweinchen, denen Bouillongift injiziert war, konnte selbst bei massiven Dosen normalen Pferdeserums keine Heilung, sondern nur eine Verzögerung im Eintritt des Todes beobachtet werden.

Der im Tierversuch von Kolle und Schlossberger in zahlreichen Versuchsreihen nachgewiesenen Unwirksamkeit des normalen Pferdeserums steht die sichere Heilwirkung des Diphtherieserums gegenüber, die, wenn die Dosis certe letalis nicht allzu sehr überschritten wird, bis zu 12 bis 18 Stunden währt. Ist mehr als die sicher tödliche Dosis des Diphtheriegiftes verankert, so helfen auch die größten Serumdosen nichts.

Ueberblicken wir die hier kurz skizzierten Tatsachen, so sehen wir die hohe Bedeutung der Wertbestimmungsmethoden der Sera, wie sie im Institut für experimentelle Therapie von Ehrlich und seinen Mitarbeitern und Schülern sowie von anderen in gleicher Richtung arbeitenden Forschern unter dauernder Fortentwicklung der Erfahrungen der Wissenschaft ausgearbeitet und verfolgt sind. Sie sind das praktisch verwertbare Ergebnis von zahlreichen Versuchen im Verfolg der theoretischen Vorstellungen und wegleitenden Ideen.

Frankfurt a. Main, im Juni 1921. **W. Kolle.**

Allgemeiner Teil.

A. Die „staatlich geprüften" Präparate.

Das erste Präparat, welches der staatlichen Kontrolle unterstellt wurde, und das überhaupt die Veranlassung zur Einrichtung einer staatlichen Serumkontrolle gab, war das Diphtherieheilserum. Nachdem dieses Serum durch Kaiserliche Verordnung vom 31. Dezember 1894 dem freien Verkehr entzogen war, wurde sein Vertrieb durch Ministerialerlaß vom 25. Februar 1895 geregelt. In diesem Erlaß wurden über die ordnungsmäßige Aufbewahrung, die Beschaffenheit der abzugebenden Sera und die Einziehung nicht einwandfreier Präparate genaue Bestimmungen getroffen. Auch wurde angeordnet, daß das Diphtherieserum nur gegen ärztliches Rezept abgegeben werden dürfe, und zwar vom 1. April 1896 ab nur noch in Fläschchen, welche mit dem amtlichen Prüfungszeichen versehen waren.

Für die Beurteilung der Brauchbarkeit einer Serumprobe wurde den Apothekern durch die Aufnahme des Serums in die Pharmakopoe ein bestimmter Anhalt gegeben. Die Angaben in der 5. Ausgabe des Arzneibuches für das Deutsche Reich lauten folgendermaßen:

„Diphtherieheilserum. Blutserum von Pferden oder Maultieren[1]), die gegen das Diphtheriegift immunisiert sind. Diphtherieheilserum darf nur in den Handel gebracht werden, nachdem es durch das Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. auf seinen Gehalt an Immunisierungseinheiten (IE.), auf Keimfreiheit und Gehalt an Konservierungsmitteln (Phenol oder Kresol) geprüft und zum Verkauf zugelassen worden ist.

Diphtherieheilserum wird in flüssiger und in fester Form in Fläschchen, die mit Kork- oder Gummistopfen verschlossen sind, oder in zugeschmolzenen Glasampullen in den Handel gebracht.

Die Gefäße tragen eine Aufschrift, die Angaben über die Fabrikationsstätte, über den Inhalt des Gefäßes in IE. sowie die Kontrollnummer enthält. Die Aufschrift enthält außerdem Angaben über den Inhalt in Kubikzentimetern oder Gramm und den Antitoxingehalt eines Kubikzentimeters oder eines Zehntel Gramm.

---

1) Ueber Rinder- und Hammel-Diphtheriesera s. S. 21 u. 35.

Der Verschluß der Fläschchen und die Glasampullen sind staatlich plombiert[1]). Auf der einen Seite der Plombe befindet sich ein Stempelzeichen der amtlichen Prüfungsstelle, auf der anderen Seite der Plombe eine Zahl, die die im Gesamtinhalte vorhandenen IE. angibt.

Flüssiges Diphtherieheilserum ist gelblich, es ist klar oder enthält höchstens einen geringen Bodensatz und besitzt den Geruch des Konservierungsmittels. Flüssiges Diphtherieheilserum mit starker bleibender Trübung oder stärkerem Bodensatze darf nicht abgegeben werden. In 1 ccm müssen mindestens 350 IE. enthalten sein.

Diphtherieheilserum, das 500 und mehr IE. in 1 ccm enthält, gilt als hochwertiges Serum.

Die am meisten gebräuchlichen Abfüllungen sind:

Nr.	0 =	200 IE.	
„	I =	600 „	(oder 500 IE.)
„	II =	1000 „	
„	III =	1500 „	

Festes Diphtherieheilserum ist getrocknetes, hochwertiges Diphtherieheilserum, das in 1 g mindestens 5000 IE. enthält und keinerlei antiseptische oder sonstige differente Zusätze erhalten hat; es wird in Vakuumröhrchen aufbewahrt. Es stellt gelbe, durchsichtige Plättchen oder gelblichweißes Pulver dar und muß sich in 10 Teilen Wasser zu einer in Farbe und Aussehen dem flüssigen Diphtherieheilserum entsprechenden Flüssigkeit lösen. Die Lösung ist durch Zusatz von 10 Teilen sterilisiertem Wasser in einem sterilisierten Fläschchen vor der Abgabe jedesmal frisch zu bereiten; sie muß bis auf kleine Eiweißflöckchen klar sein.

Die verschiedenwertigen Diphtherieheilsera werden außer durch die Aufschrift durch die Farbe der Umhüllung gekennzeichnet; die Farbe ist bei

200	bis 499	IE.	gelb
500	„ 999	„	grün
1000	„ 1499	„	weiß
1500	„ 1999	„	rot
2000	„ 2999	„	violett
3000	„ 3999	„	blau
4000	„ 5999	„	weiß mit gelbem Querstreifen
6000	„ 7999	„	weiß mit grünem Querstreifen
8000	und mehr	„	weiß mit rotem Querstreifen.

Diphtherieheilserum einer bestimmten Kontrollnummer, dessen Einziehung verfügt wurde, darf nicht abgegeben werden.

Kühl, aber frostfrei, und vor Licht geschützt aufzubewahren."

Diphtherieserum wird zurzeit in Deutschland hergestellt in den Farbwerken in Höchst a. M., in der Chemischen Fabrik vormals Schering in Berlin, in der Chemischen Fabrik von E. Merck in Darmstadt, dem Serumlaboratorium Ruete-Enoch in Hamburg, dem Sächsischen Serumwerk in Dresden, in den Behringwerken in Marburg a. L., dem Seruminstitut Bram in Oelzschau

1) Vgl. S. 32.

bei Leipzig und im Pharmazeutischen Institut L. W. Gans in Oberursel (Taunus).

Diphtherie-Hammelserum bringen die Behringwerke und das Sächsische Serumwerk in den Handel, Diphtherie-Rinderserum die Höchster Farbwerke, die Behringwerke, das Seruminstitut Bram und das Serumlaboratorium Ruete-Enoch. Letzteres stellt auch ein besonderes eiweißarmes Diphtherieserum (s. S. 35) her.

Ein Jahr nach der Einführung der staatlichen Kontrolle für das Diphtherieserum wurde auch das Tetanusserum zur staatlichen Prüfung zugelassen. Der im Institut ausgearbeitete und im Reichsgesundheitsamt im einzelnen festgesetzte Entwurf der Prüfungsvorschrift wurde durch Ministerialerlaß vom 2. November 1903 genehmigt. Endgültig geregelt wurde die Prüfung und der Vertrieb der Tetanussera durch Ministerialerlaß vom 10. Mai 1910, der auch für die Abgabe in den Apotheken, die Verpackung, die Einziehung abgeschwächter Sera usw. analoge Bestimmungen vorsieht, wie sie für die Diphtheriesera bereits bestanden.

Das Deutsche Arzneibuch (5. Ausgabe, 1919) enthält folgende Angaben:

„Tetanusheilserum. Blutserum von Pferden, die gegen das Tetanusgift immunisiert sind. Tetanusheilserum darf nur in den Handel gebracht werden, nachdem es durch das Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. auf seinen Gehalt an Antitoxineinheiten (AE.), auf Keimfreiheit und Gehalt an Konservierungsmitteln (Phenol oder Kresol) geprüft und zum Verkaufe zugelassen worden ist.

Tetanusheilserum wird in flüssiger und fester Form in Fläschchen, die mit Kork- oder Gummistopfen verschlossen sind, oder in zugeschmolzenen Glasampullen in den Handel gebracht.

Die Gefäße und die Verpackung tragen eine Aufschrift, die Angaben über die Fabrikationsstätte, über den Inhalt des Gefäßes in AE., sowie die Kontrollnummer enthält. Die Aufschrift enthält außerdem Angaben über den Inhalt in Kubikzentimetern oder Gramm und den Antitoxingehalt eines Kubikzentimeters oder eines Zehntel Gramm oder Gramm.

Der Verschluß der Fläschchen und die Glasampullen sind staatlich plombiert. Auf der einen Seite der Plombe befindet sich ein Stempelzeichen der amtlichen Prüfungsstelle, auf der anderen eine Zahl, die die im Gesamtinhalte vorhandenen AE. angibt.

Flüssiges Tetanusheilserum ist gelblich; es ist klar oder enthält höchstens einen geringen Bodensatz und besitzt den Geruch des Konservierungsmittels. Flüssiges Tetanusheilserum mit starker, bleibender Trübung oder stärkerem Bodensatze darf nicht abgegeben werden.

Festes Tetanusheilserum ist getrocknetes Tetanusheilserum, das keinerlei antiseptische oder sonstige differente Zusätze erhalten hat und in Vakuumröhrchen aufbewahrt wird. Es stellt gelbliche, mehr oder minder durchscheinende Plättchen oder ein gelblich-weißes Pulver dar und muß sich innerhalb einer halben Stunde in 10 Teilen Wasser zu einer in Farbe und Aussehen dem flüssigen Tetanusheilserum entsprechenden Flüssigkeit lösen. Die Lösung ist durch Zusatz von 10 Teilen sterilisiertem Wasser in einem

sterilisierten Fläschchen vor der Abgabe jedesmal frisch zu bereiten; sie muß bis auf kleine Eiweißflöckchen klar sein.

4-faches Tetanusheilserum muß in 1 ccm mindestens 4 AE., in 1 g mindestens 40 AE. enthalten,

6-faches Tetanusheilserum muß in 1 ccm mindestens 6 AE., in 1 g mindestens 60 AE. enthalten.

Es können auch höherwertige Tetanusheilsera hergestellt und in den Handel gebracht werden, die gleichfalls der staatlichen Prüfung unterliegen.

Tetanusheilserum kommt in 6 Füllungen in den Handel:

Füllung I enthält 20 AE., entsprechend 5 ccm eines 4-fachen flüssigen oder 0,5 g eines 40-fachen festen Tetanusheilserums;

Füllung II enthält 100 AE., entsprechend 25 ccm eines 4-fachen flüssigen oder 2,5 g eines 40-fachen festen Tetanusheilserums;

Füllung III enthält 200 AE., entsprechend 50 ccm eines 4-fachen flüssigen oder 5 g eines 40-fachen festen Tetanusheilserums:

Füllung IV enthält 400 AE., entsprechend 100 ccm eines 4-fachen flüssigen oder 10 g eines 40-fachen festen Tetanusheilserums;

Füllung I D enthält 20 AE., entsprechend $3^1/_3$ ccm eines 6-fachen flüssigen oder $^1/_3$ g eines 60-fachen festen Tetanusheilserums oder verhältnismäßig geringeren Mengen eines mehr als 6-fachen flüssigen oder eines mehr als 60-fachen festen Tetanusheilserums;

Füllung II D enthält 100 AE., entsprechend $16^2/_3$ ccm eines 6-fachen flüssigen oder $1^2/_3$ g eines 60-fachen Tetanusheilserums oder verhältnismäßig geringeren Mengen eines mehr als 6-fachen flüssigen oder eines mehr als 60-fachen festen Tetanusheilserums.

Tetanusheilserum einer bestimmten Kontrollnummer, dessen Einziehung verfügt wurde, darf nicht abgegeben werden.

Kühl, aber frostfrei und vor Licht geschützt aufzubewahren."

Mit der Herstellung von Tetanusserum befassen sich in Deutschland jetzt folgende Fabriken: die Höchster Farbwerke, das Sächsische Serumwerk in Dresden, die Behringwerke in Marburg a. L., das Seruminstitut Bram in Oelzschau bei Leipzig und das Pharmazeutische Institut L. W. Gans in Oberursel (Taunus).

Im Jahre 1899 wurde die staatliche Prüfung auch für Schweinerotlaufserum angeordnet. Für dieses Serum gelten zurzeit die im Jahre 1919 neu aufgestellten Prüfungsvorschriften.

Rotlaufsera werden zurzeit hergestellt von den Höchster Farbwerken, dem Serumlaboratorium Ruete-Enoch in Hamburg, dem Pharmazeutischen Institut L. W. Gans in Oberursel (Taunus), der Gesellschaft für Seuchenbekämpfung in Frankfurt a. M.-Niederrad, den Behringwerken in Marburg a. L., dem Sächsischen Serumwerk in Dresden, dem Seruminstitut Bram in Oelzschau und der Rheinischen Serum-Gesellschaft, G. m. b. H. in Cöln-Merheim.

Gleichfalls im Jahre 1899 wurde das Kochsche Tuberkulin der staatlichen Prüfung unterstellt. Die Verordnungen, welche die Prüfungsmaßnahmen, die Abgabe in plombierten Fläschchen und den Vertrieb in den Apotheken regelten, galten zunächst nur für das Alttuberkulin Koch, wurden aber am 1. März 1910 auf Bovotuberkulin und am 7. August 1911 auf das albumosenfreie Tuberkulin ausgedehnt.

Das deutsche Arzneibuch enthält folgende Angaben:

„Alttuberkulin. Nach den Angaben von R. Koch aus glyzerinhaltigen Fleischbrühkulturen der Tuberkelbazillen durch Eindampfen auf ein Zehntel und darauf folgendes Filtrieren gewonnene Flüssigkeit. Alttuberkulin enthält neben dem wirksamen Stoffe etwa 40 Proz. Glyzerin sowie Bestandteile der Fleischbrühe; ein Konservierungsmittel wird dem Alttuberkulin nicht zugesetzt. Alttuberkulin darf nur in den Handel gebracht werden, nachdem es durch das Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. auf seinen gleichbleibenden Gehalt an spezifischem Toxin geprüft und zum Verkauf zugelassen worden ist.

Alttuberkulin wird nur in Fläschchen abgegeben, deren Verschluß staatlich plombiert ist und deren Aufschrift Angaben über die Fabrikationsstätte enthält. Auf dem von dem Plombenverschlusse gesicherten Deckpapiere tragen sie das Datum der Prüfung und die Kontrollnummer; auf der einen Seite der Plombe befindet sich ein Stempelzeichen der amtlichen Prüfungsstelle.

Alttuberkulin stellt eine klare, braune, eigenartig würzig riechende Flüssigkeit dar, die in Wasser leicht löslich ist.

Verdünnungen von Alttuberkulin sind in folgender Weise herzustellen: Zunächst wird durch Vermischen von 1 Raumteil Alttuberkulin mit 9 Raumteilen einer 0,5-proz., mit sterilem Wasser angefertigten Karbolsäurelösung eine 10-proz. Tuberkulinlösung hergestellt, die als Stammlösung für weitere Verdünnungen dienen kann. Aus dieser werden die weiteren Verdünnungen in der Weise hergestellt, daß von der Stammlösung 1 Raumteil mit 9 Raumteilen 0,5-proz. Karbolsäurelösung und von der so gewonnenen Lösung wieder 1 Raumteil mit 9 Raumteilen 0,5-proz. Karbolsäurelösung vermischt wird usw.

Die zur Herstellung der Verdünnungen bestimmten Meßzylinder und Pipetten sowie die zur Aufnahme der Verdünnungen bestimmten Arzneigläser sind unmittelbar vor der Herstellung der Verdünnung im Trockenschrank bei 150° zu sterilisieren. Die Aufnahmegefäße müssen mit dem Gehalte der Verdünnungen an Alttuberkulin und dem Tage der Herstellung bezeichnet werden. Der Inhalt angebrochener Originalfläschchen von Alttuberkulin muß sogleich zu einer Stammlösung verarbeitet werden. Verdünnungen des Tuberkulins dürfen nur in keimfreiem Zustand und in zugeschmolzenen Glasampullen vorrätig gehalten werden.

Aus diesem flüssigen Tuberkulin wird auch ein festes Präparat (Trockentuberkulin) gewonnen, das ebenfalls der staatlichen Prüfung untersteht. Es stellt ein grauweises Pulver dar, das sich leicht in Wasser löst. In der Aufschrift auf dem Fläschchen ist die Angabe enthalten, in wieviel Raumteilen Wasser 1 Gewichtsteil des Pulvers zu lösen ist, damit die Lösung dem flüssigem Tuberkulin entspricht.

Kühl und vor Licht geschützt aufzubewahren.

Vorsichtig aufzubewahren."

Tuberkuline werden zurzeit von den Höchster Farbwerken, der Chemischen Fabrik E. Merck in Darmstadt, dem Serumlaboratorium Ruete-Enoch in Hamburg und den Behringwerken in Marburg a. L. zur staatlichen Prüfung gestellt.

Für Meningokokkenserum wurde die staatliche Prüfung im Jahre 1915 vorgeschrieben. Die durch Ministerialerlaß vom 13. November 1915 mitgeteilten Prüfungsbestimmungen sind als vorläufige hingestellt und sollen später auf Grund der inzwischen gesammelten Erfahrungen revidiert werden.

In das Deutsche Arzneibuch ist das Meningokokkenserum bisher nicht aufgenommen.

Meningokokkensera werden zurzeit in den Verkehr gebracht von den Höchster Farbwerken, dem Serumlaboratorium Ruete-Enoch in Hamburg, dem Seruminstitut Bram in Oelzschau und der Chemischen Fabrik von E. Merck in Darmstadt.

Außer den bisher genannten Präparaten, deren Prüfung gesetzlich vorgeschrieben ist, werden im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. noch weitere Sera amtlich geprüft, ohne daß diese Prüfung obligatorisch gemacht ist. Es handelt sich hier um Sera, deren therapeutische Wirksamkeit bisher nicht allseits anerkannt wird und die noch weiter in der Praxis erprobt werden sollen. Man hat deshalb von der endgültigen Unterstellung dieser Sera unter die staatliche Prüfung zunächst Abstand genommen und sie einstweilen zu einer provisorischen Prüfung zugelassen, zu der die Herstellungsstätten jedoch nicht verpflichtet sind.

Zu diesen Präparaten gehört in erster Linie das Dysenterieserum. Die Anregung zu der jetzt geübten Form der Ruhrserumprüfung gab während des Krieges das preußische Kriegsministerium, das großen Wert darauf legte, daß bei allen an die Lazarette verausgabten Ruhrheilseren eine gleichmäßige Gewähr für ihre Wirksamkeit gegeben wäre. Durch Ministerialerlaß vom 11. Juni 1918 wurde das Institut zur vorläufigen Prüfung der für die Heeresverwaltung bestimmten Sera nach der von ihm vorgeschlagenen Methodik ermächtigt. Nach Beendigung des Krieges ist die Prüfung, soweit sie von den Fabriken gewünscht wird, in gleicher Weise fortgesetzt worden. Sie hat sich inzwischen so bewährt, daß die baldige endgültige Unterstellung der Ruhrsera unter die staatliche Prüfung wünschenswert erscheint.

Ruhrsera werden zurzeit zur Prüfung gestellt von den Höchster Farbwerken, von der Chemischen Fabrik E. Merck in Darmstadt, dem Serumlaboratorium Ruete-Enoch in Hamburg, dem Sächsischen Serumwerk in Dresden, den Behringwerken in Marburg a. L., dem Seruminstitut Bram in Oelzschau und dem pharmazeutischen Institut L. W. Gans in Oberursel (Taunus).

Weiterhin werden provisorisch geprüft:

das Antistreptokokkenserum nach Aronson der Chemischen Fabrik vormals Schering in Berlin,

das Schweineseucheserum („Suisepsin") der Höchster Farbwerke und das Geflügelcholeraserum („Galloserin") der Höchster Farbwerke.

Der Zweck der staatlichen provisorischen Prüfung ist zunächst, daß für die Gleichwertigkeit aller in den Handel gebrachten Präparate der betreffenden Serumart Sorge getragen und dem Praktiker dadurch die Möglichkeit gegeben wird, die Wirksamkeit der Sera eingehender zu studieren und zu vergleichen. Außerdem bietet diese Prüfung aber auch noch den Vorteil, daß sie mit ungenügender Sorgfalt hergestellte Sera vom Markt zurückhält, indem sie 1) die Herstellung der Sera am Fabrikationsorte kontrolliert und 2) gleichzeitig bei der Wertbemessung alle Sera auf ihre äußere Beschaffenheit, ihren Phenolgehalt und ihren Keimgehalt prüft. Es werden in letzterer Hinsicht nur solche Sera zugelassen, die frei von gröberen Niederschlägen sind, nicht mehr als 0,5 Proz. Phenol enthalten und deren Gehalt an (saprophytischen) Keimen das erlaubte Maß — bei den für die Veterinärpraxis bestimmten Seris sind bis 100 Keime im Kubikzentimeter gestattet — nicht überschreitet. Dadurch werden alle stärker keimhaltigen oder sonst verunreinigten Präparate, deren Haltbarkeit, ganz abgesehen von ihrer eventuellen Schädlichkeit, eine sehr unsichere sein muß, vom Verkehr ausgeschlossen. Es sei dabei bemerkt, daß nur solche Sera zur staatlichen provisorischen Prüfung zugelassen werden, hinsichtlich deren die Fabrikationsstätten sich verpflichten, nur geprüftes Serum, daneben aber nicht auch ungeprüftes in Deutschland in den Handel zu bringen.

Der Umstand, daß mehrfach die Zulassung neuer Sera zur „staatlichen provisorischen Prüfung" nachgesucht wurde, spricht deutlich dafür, daß man in Interessentenkreisen von dem Werte dieser Form der staatlichen Prüfung überzeugt ist. Wenn öfters dem Wunsche um Unterstellung neuer Sera unter die staatliche Kontrolle nicht entsprochen werden konnte, so lag das meist daran, daß für das betreffende Serum bis dahin keine exakt arbeitende Wertbestimmungsmethode bekannt war und auch nicht ermittelt werden konnte. Wie schwierig dies sein kann, haben speziell Versuche mit dem von der Firma Merck hergestellten Milzbrandserum gezeigt, bei dem es in Uebereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen bisher im Institute nicht gelungen ist, eine quantitativ genau arbeitende Prüfungsmethode zu finden (Schubert, 167).

B. Die Zulassung zur staatlichen Prüfung.

Beabsichtigt eine Fabrik, eines jener Präparate in den Handel zu bringen, für die die staatliche Prüfung gesetzlich vorgeschrieben oder zugelassen ist, so hat sie sich mit einem entsprechenden Gesuch an das preußische Ministerium für Volkswohlfahrt zu wenden (bei nichtpreußischen Fabriken durch Vermittelung der betreffenden Regierung). Die Genehmigung eines solchen Gesuches wird davon abhängig gemacht werden, daß die zuständige örtliche Behörde gegen die Qualifikation des Leiters und die Einrichtung der Fabrik keine Bedenken erhebt und daß die Fabrik sich bestimmten Bedingungen, welche sich auf die Kontrolle des Tierbestandes, die Serumgewinnung und Serumabgabe beziehen, unterwirft.

Handelt es sich um Sera usw., die bisher der staatlichen Kontrolle noch nicht unterstanden, so ist die beantragte Zulassung zur staatlichen Prüfung außerdem noch davon abhängig, daß für die spezifische Wirksamkeit des Präparates eine genaue Wertbemessungsmethode schon festgestellt ist oder doch ermittelt werden kann.

Die allgemeinen Bedingungen, welche jede Fabrik, die ein Serum der staatlichen Kontrolle unterstellen will, zu übernehmen hat, sind außer der Hinterlegung einer Kaution und der Zahlung bestimmter Prüfungsgebühren folgende:

1. ist der Tierbestand der dauernden Kontrolle eines approbierten Tierarztes zu unterstellen;
2. ist ein Hauptbuch zu führen, welches ersehen läßt:
   a) die Nummern der Tiere, von denen Blut zur Herstellung des betreffenden Serums entnommen ist,
   b) Tag der Blutentnahme, Menge des entnommenen Blutes und des aus ihm gewonnenen Serums,
   c) Ergebnis der Wertbestimmung des Serums,
   d) Tag der Abfüllung und der amtlichen Abnahme des Serums,
   e) Tag des Abschlusses der amtlichen Kontrolle und Ergebnis der Prüfung;
3. ist ein staatlicher Kontrollbeamter anzustellen, der die Einsendung der Proben, die Unterverschlußnahme des Serums während der Prüfung, die Ueberwachung der Abfüllung und die Plombierung der für den Verkehr bestimmten Gefäße auszuüben hat (vgl. S. 31);
4. muß eine bestimmte Literzahl Serum als Mindestmenge zur Prüfung gestellt werden;
5. ist das frische Serum mit einer geringen Menge eines Antiseptikums (z. B. 0,5 Proz. Phenol) zu versetzen. Sera, die bei der staatlichen Prüfung nicht als steril befunden werden,

dürfen zum Gebrauch beim Menschen nicht abgegeben werden (vgl. S. 33);
6. soll mit jeder Prüfung ein Begleitschein nach folgendem Muster eingesandt werden:

Begleitschein Nr. .....
für die staatliche Kontrollstation
zu dem aus .....
in .....
eingesandten .....

Kontroll-(Hauptbuch) Nr. .....
(entsprechend der Aufschrift auf dem Probefläschchen)
Pferde Nr. .....
Tag der Blutentziehung .....
Blutmenge in ccm .....
Menge des erhaltenen Serums .....
Prüfungsergebnis in der Fabrik { Versuchstier Nr. ..... / Immunitätseinheiten ..... / Keimgehalt .....
Menge des Konservierungsmittels .....
Tag der amtlichen Abfüllung .....
Datum der Einsendung zur Kontrollstation .....
Bemerkungen .....
.....
.....

Unterschriften
des Abnahmebeamten und des Expedienten der Fabrik:
....

Prüfungsergebnis
zum Begleitschein No. .....
betr. das von .....
am .....
eingesandte .....
(Menge ..... Liter)
eingetroffen am ..... Vorm. / Nachm.
Kontroll-(Hauptbuch) Nr. .....
Pferde Nr. .....

I. Die Lösung entspricht den gesetzlichen Anforderungen und hat den angegebenen Wert von ..... Immunitätseinheiten.
II. Die Lösung wird beanstandet, weil .....
.....
.....

Der Kontrollstation sind demnach an Untersuchungsgebühren gutzuschreiben .....
Bemerkungen .....
Frankfurt a. M., den .....
(L. S.) Unterschrift des Kontrollarztes:
.....

C. Die örtliche Kontrolle an der Herstellungsstätte.

Aus den vorstehenden Bedingungen geht hervor, daß die staatliche Kontrolle sich nicht allein auf die amtliche Wertbemessung der ihr unterstellten Sera beschränkt, sondern auch für deren zweckmäßige Herstellung Sorge trägt. Um letztere genau kontrollieren zu können, sind die Fabriken verpflichtet, über alle für die Gewinnung der Sera wichtigen Punkte sorgfältig Buch zu führen.

Die Herstellung der Sera in den Fabriken ist in technischer Beziehung vielfach mustergültig ausgearbeitet. Als Serumspender benutzt man in der Regel Pferde oder Maultiere. Zur Herstellung bestimmter Sera werden aber auch andere Tierarten, z. B. Rinder und Schafe, verwendet (vgl. S. 35).

Die Vorteile der Pferde beruhen darin, daß sie bei der Vorbehandlung leicht zu handhaben und verhältnismäßig leicht und sicher zu hohen Immunitätsgraden zu bringen sind, daß bei ihnen durch Aderlaß aus der Halsvene sich bequem größere Blutmengen entnehmen lassen und daß aus Pferdeblut sich das Serum reichlicher und klarer abscheidet, als z. B. aus Rinderblut. Nur solche Tiere dürfen zur Serumgewinnung benutzt werden, deren innere Organe völlig gesund sind.

Auf die verschiedenen Immunisierungsmethoden, welche alle auf dem Ehrlich-Behringschen Immunisierungsmodus, speziell dem zuerst von Ehrlich (51, 60) gefundenen Prinzip der Immunitätssteigerung beruhen, kann hier nicht näher eingegangen werden. Nähere Angaben hierüber sind in den zusammenfassenden Arbeiten von Kretz (95), Levaditi (100), Ficker (61), Heller und Krumbein (71), Schürmann (167a), Marxer (115) und Nicolle, Frasey, Debains und Nicolas (137) zu finden. Dagegen soll die Entnahme des Serums von den Pferden mit einigen Worten skizziert werden.

Haben die Tiere den gewünschten Grad der Immunität erreicht, so werden sie „geblutet", d. h. es wird ihnen durch Aderlaß Blut entzogen. v. Behring und Knorr (15) haben schon darauf hingewiesen, daß zur Blutentnahme natürlich nur ein solcher Zeitpunkt zu wählen ist, wo das serumliefernde Tier gesund ist. Als Kriterien hierfür bezeichnen sie:

1) das normale gesunde Aussehen der Tiere,
2) das normale Verhalten von Temperatur und Puls,
3) das normale Körpergewicht, also mindestens das Gewicht, welches vor der Einleitung der letzten Reaktionsperiode notiert war,
4) den normalen Verlauf des Gerinnungsprozesses und der Serumabscheidung in Blutproben, die durch Aderlaß gewonnen sind.

Die Blutentnahme aus der Jugularis, welcher zweckmäßig eine Probeblutung voraufgeht, um zu sehen, ob das Serum den gewünschten Gehalt an Antikörpern tatsächlich erreicht hat, muß natürlich unter aseptischen Maßnahmen und möglichst schonend ausgeführt werden.

Zweckmäßig geht man in folgender Weise vor: Man macht zunächst einen etwa 10 cm langen Hautschnitt, etwa 4—5 cm vor der durch Kompression mit Kissen geschwellten Vene. Zur Punktion der letzteren wird der angelegte Hautschnitt mit der Haut so verschoben, daß er über die Jugularis fällt. Diese Hautverschiebung schließt später den Schlitz in der Vene so gut, daß nach Entfernung der Kompression die Blutung sofort steht. Dadurch wird jede Naht überflüssig und man kann bis etwa 50 Aderlässe auf einer 4—5 cm langen Strecke der Vene machen.

Die Punktion der Vene selbst erfolgt mit einem schlanken Troikart, auf den sich ein Schlauch aufsetzten läßt, der das Blut in den Aderlaßzylinder leitet.

Bei jeder Blutentnahme liefert ein Pferd durchschnittlich 5—6 l Blut, aus denen man ungefähr 3 l reines Serum erhält. Das Blut wird in hohen Standgefäßen (Aderlaßzylindern) steril aufgefangen. Diese Zylinder, welche ungefähr 1500 ccm fassen, werden vor der Blutentnahme, 3-fach verschlossen und mit einem eingeführten Rohr (siehe Fig. 1 a) versehen, im Dampf sterilisiert. Dieser 3-fache Deckel, welcher aus Flanell (*a*), einem Blechdeckel (*b*) und einem Papierumschlag (*c*) besteht, ist so eingerichtet, daß nach Füllung des Zylinders durch Drehen der drei Deckel ein trockener Blechteil die infolge des Ausziehens des Rohres blutigen Ränder vom Papier und Flanell trennt (Fig. 1 b). Das Blut bleibt in diesem Gefäß 48 Stunden stehen, bis sich das Serum abgeschieden hat. Dann wird das Serum abgehoben und in „Sammelgefäße" gefüllt. Zum Abheben des Serums benutzt man Heber, deren untere Oeffnung seitlich liegt, so daß man mit ihnen das Koagulum vom Glase abdrängen kann. Der Heber wird durch Auspressen der Luft im Schlauch in Gang gesetzt.

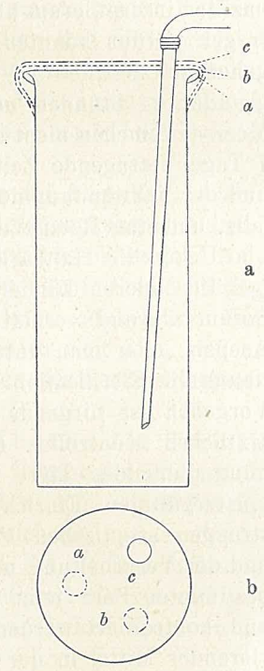

Fig. 1.

Da es zeitweise vorkommt, daß das Serum sich ungenügend von dem Blutkuchen abscheidet, ist man bestrebt gewesen, Methoden zu finden, um die in dem Blutkuchen noch zurückbleibenden Serummengen zu gewinnen. Dies hat man z. B. durch besonders konstruierte Apparate, in denen der Blutkuchen nachträglich ausgepreßt wird, zu erreichen gesucht. Diese Apparate haben vor allem den Nachteil, daß man gezwungen ist, den Blutkuchen umzufüllen, und daß bei diesen Manipulationen häufig die Fernhaltung von verunreinigenden Bakterien unmöglich ist. Die Durchführung strenger Asepsis gestattet ein Verfahren Blumenthals, bei dem am Deckel des Blutentnahmegefäßes vor dem Verschluß und der Sterilisierung ein mit Schrotkörnern gefülltes starkwandiges Fläschchen so aufgehängt wird, daß es frei in dem oberen Teile des Gefäßes schwebt. Hat man nach der Gerinnung des Blutes das abgeschiedene Serum aus dem Apparat entleert, so braucht man nur den durch den Deckel führenden Faden außen zu durchtrennen, um das Herabfallen des Fläschchens auf den Blutkuchen zu bewirken. Der Druck des auffallenden Fläschchens genügt, wie die Erfahrung gezeigt hat, um die im Blutkuchen zurückgehaltenen Serummengen frei zu machen.

Zur Konservierung wird das Serum mit geringen Mengen eines antiseptischen Mittels versetzt (0,5 Proz. Phenol oder 0,4 Proz. Trikresol).

Der Zusatz eines Desinfektionsmittels ist für alle in Deutschland in Verkehr zu bringenden Schutz- und Heilsera vorgeschrieben und bisher beibehalten worden, um etwaige Keime, die trotz aller Vorsichtsmaßnahmen bei der Verarbeitung in das Serum gelangten, abzutöten oder ihre Anreicherung zu verhindern. Außerdem war für diese Vorschrift die Ueberlegung maßgebend, daß der Rotz der Pferde in seinen Anfangsstadien oft sehr schwer diagnostizierbar ist und daß gelegentlich einmal bei unerkannter Rotzinfektion eines Serumpferdes Rotzbazillen in das Serum übergehen und mit diesem auf den Menschen übertragen werden könnten. Nach den Untersuchungen von Bonhoff (32) gehen Rotzbazillen in einem karbolisierten Serum in kurzer Zeit zugrunde; 24 Stunden nach der Einsaat vermochte ein solches Serum Meerschweinchen nicht mehr mit Rotz zu infizieren. Die allermindestens 7 Tage betragende Zeit, die zwischen der Blutentnahme vom Pferde und der Verwendung des Serums beim Menschen verläuft, genügt jedenfalls, um eine Rotzgefahr mit Sicherheit auszuschließen.

Ueber die Haltbarkeit der mit Phenol versetzten Sera vgl. S. 74.

In anderen Ländern sieht man von antiseptischen Zusätzen zum Serum ab und verläßt sich, wie z. B. in der Schweiz, ganz auf die Asepsis, oder man unterwirft, wie in Frankreich, die Sera einer fraktionierten Sterilisation. Ueber ungünstige Erfahrungen bei diesem Vorgehen ist nirgends berichtet worden. Bei der fortlaufenden tierärztlichen Kontrolle, der bestimmungsgemäß alle zur Serumgewinnung dienenden Tiere unterstehen müssen, bei den vielfach geradezu mustergültigen Einrichtungen der Serumgewinnungstätten und den strengen aseptischen Vorsichtsmaßregeln, die bei der Blutentnahme und der Verarbeitung und Abfüllung der zum Gebrauch beim Menschen bestimmten Sera jetzt in allen deutschen Serumfabriken durchgeführt und kontrolliert werden, würde ein Verzicht auf den Zusatz konservierender Mittel in der Tat unbedenklich erscheinen.

Das vom Blutkuchen abgehobene und mit Phenol versetzte Serum bleibt in den Sammelgefäßen in trocknen Kühlkammern (bei + 7°) so lange stehen, bis es in die für den Verkehr bestimmten Gefäße abgefüllt werden soll.

Die Abfüllung erfolgt entweder in Fläschchen, die mit Kork- oder besser Gummistopfen verschlossen werden, oder in Glasampullen, die nach der Füllung zugeschmolzen werden. Es ist selbstverständlich, daß die Fläschchen und Ampullen sowie alle bei der Abfüllung gebrauchten Glasgeräte keimfrei gemacht sein müssen. Die Glassachen werden durch trockne Hitze (150°), Kork- und Gummistopfen in strömendem Dampf sterilisiert. Das Zuschmelzen der Ampullen muß mit großer Vorsicht geschehen, um die Gerinnung des Serums zu verhüten.

Die Abgabe der Heilsera in geschmolzenen Ampullen ist zweifellos die empfehlenswerteste Methode, sie bietet die sicherste Gewähr gegen eine nachträgliche bakterielle Verunreinigung. In den Serumfabriken des Auslandes ist dieses Verfahren schon lange in Gebrauch und hat sich überall ausgezeichnet bewährt. In Deutschland zogen viele Aerzte die weithalsigen, mit Gummistopfen oder Korken verschlossenen Fläschchen vor, weil sie aus ihnen das Serum mit der Injektionsspritze ohne aufgesetzte Kanüle bequem entnehmen konnten und fürchteten, daß das Oeffnen der Ampullen mit gewissen Schwierigkeiten verknüpft sei. Die außerordentlichen Hindernisse jedoch, die sich gegen Ende der Kriegszeit der Beschaffung guter Gummistopfen und einwandfreien Korkenmaterials zu angemessenen Preisen entgegenstellten und die auch jetzt noch nicht behoben sind, gaben Veranlassung, daß im Jahre 1918 für alle zur Verwendung beim Menschen bestimmten Sera die Abgabe in zugeschmolzenen Glasampullen durch Ministerialerlaß vorgeschrieben wurde.

Die Verwendung dunkelfarbigen Glases für die Ampullen ist empfehlenswert, aber nicht notwendig. Jeder Ampullenpackung ist seitens der Fabrik eine kleine Feile beizulegen, oder noch besser ist jede Ampulle am Halse mit einem Feilstrich zu versehen, damit ihre Oeffnung ohne Schwierigkeit und ohne Splitterung des Glases möglich ist. Der Hals der Ampulle muß an der angefeilten Stelle so weit sein, daß er die Einführung der Spritzenkanüle zum Aufsaugen des Serums bequem zuläßt.

Die sachgemäße Herstellung und Abgabe der Sera in den Gewinnungstätten wird durch amtliche Organe der Regierung, in deren Bezirken die Fabriken gelegen sind, überwacht. Jede Fabrik, die staatlich zu prüfende Sera herzustellen beabsichtigt, hat der Regierung eine geeignete Persönlichkeit vorzuschlagen, die die Durchführung der für den Betrieb gültigen Vorschriften dauernd kontrollieren soll und im Falle der Zustimmung der Regierung als staatlicher Kontrollbeamter angestellt und vereidigt wird.

Der staatliche Kontrollbeamte ist für die vorschriftsmäßige Behandlung und Abfüllung der gewonnenen Sera verantwortlich. Er hat ein Dienstbuch zu führen, aus dem ersichtlich sein müssen:

1) die Nummern der Pferde, von denen Blut zur Herstellung des betreffenden Serums entnommen ist,

2) Tag der Blutentnahme, Menge des Blutes und des aus ihm erhaltenen Serums,

3) Ergebnis der Prüfung in der Fabrik,

4) Art und Menge des Konservierungsmittels,

5) Tag der amtlichen Abnahme des Serums und der Einsendung der Proben zur staatlichen Prüfung,

6) Tag und Ergebnis der staatlichen Prüfung.

Die Gesamtmenge des zur Prüfung gestellten Serums hat er in dem Stammgefäß so lange unter Verschluß zu halten, bis die Entscheidung der Prüfungsstelle über die Zulassung des Serums eingelaufen ist. Erst wenn die Mitteilung eingegangen ist, daß das Serum den gesetzlichen Ansprüchen genügt, darf das Sammelgefäß geöffnet und das Serum unter seiner Aufsicht abgefüllt werden. Der amtliche Verschluß der einzelnen Fläschchen besteht in einer Papiertektur, die mit einem sicheren Plombenverschluß festgehalten wird. Die Plombe trägt auf der einen Seite als Zeichen der amtlichen Abfüllung einen Adler (Preußen) bzw. das Hoheitszeichen des betreffenden Staates, in welchem die örtliche Kontrolle ausgeübt wird (so z. B. für Hessen einen Löwen). Auf der anderen Plombenseite ist die Zahl der in der Flüssigkeit enthaltenen Immunisierungseinheiten angegeben, doch ist zugelassen, diese Zahl statt auf die Plombe in geeigneter Weise auf die Fläschchen mit Dauerfarbe aufzudrucken. Die Fläschchen tragen außerdem die Etikette der Fabrik mit dem Aufdruck der Kontrollnummer. Werden zur Abfüllung der Präparate anstatt verkorkter Fläschchen zugeschmolzene Ampullen verwendet, so wird die amtliche Abfüllung entweder durch Anbringen einer Plombe am Ampullenhals, der zu diesem Zweck eine Einschnürung tragen muß, oder durch einen Aetzstempel gekennzeichnet, der das staatliche Hoheitszeichen und die Umschrift „Staatliche Serumkontrolle“ trägt. Zum Befestigen der Plomben an den Fläschchen und Ampullen ist Spiraldraht zu verwenden.

Wenn ein Serum die vorschriftsmäßigen Eigenschaften nicht besitzt, wird es an die Fabrik nur dann zurückgegeben, wenn die Beanstandung wegen Mindergehaltes an Immunisierungseinheiten, mangelnder Klarheit oder sonstiger unschwer zu behebender vorschriftswidriger Eigenschaften erfolgt ist. War dagegen die Beanstandung durch gesundheitsschädliche Beschaffenheit des Serums (z. B. pathogene Keime, zu hohen Phenolgehalt usw.) veranlaßt, so entscheidet das staatliche Prüfungsinstitut, ob die Flüssigkeit vernichtet werden muß, oder ob durch bestimmte, von ihm vorzuschreibende Behandlung die Masse in einen vorschriftsmäßigen Zustand versetzt und zur nochmaligen Prüfung zugelassen werden kann. Für den Fall, daß die Vernichtung angeordnet werden soll, muß die Genehmigung des vorgesetzten Ministeriums eingeholt werden. Wird das Serum der Fabrik zurückgegeben, so ist diese verpflichtet, alle Anordnungen des Instituts genauestens zu befolgen und mitzuteilen, ob und wieweit das geschehen ist.

D. Die Prüfung im Institut für experimentelle Therapie.

Der zweite Akt der staatlichen Kontrolle ist die amtliche Prüfung des Serums im Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.

Diese Prüfung bezieht sich auf die Feststellung 1) der Unschädlichkeit und 2) des Wirkungswertes des zu prüfenden Serums.

I. Die Prüfung auf Unschädlichkeit.

Als „unschädlich“ wird die eingesandte Serumprobe angesehen, wenn sie

1) völlig klar und frei von gröberen Niederschlägen ist;

2) keine bakteriellen Verunreinigungen enthält bzw. bei den für die Veterinärpraxis bestimmten Seris den erlaubten Keimgehalt von 100 Keimen in 1 ccm Serum nicht überschreitet;

3) nicht mehr als 0,5 Proz. Phenol oder 0,4 Proz. Trikresol enthält und

4) frei von Toxinen, speziell Tetanustoxinen, ist.

Zur Feststellung dieser Eigenschaften wird das zu prüfende Serum zunächst einer makroskopischen Besichtigung unterzogen. Das Serum darf, äußerlich betrachtet, höchstens einen geringen Bodensatz zeigen, muß aber unter allen Umständen völlig klar sein. Serumproben mit bleibenden Trübungen, welche als Zeichen stattgehabter Zersetzungen anzusehen sind, werden zurückgewiesen.

Sodann folgt eine Sterilitätsprüfung des Serums nach den üblichen bakteriologischen Methoden, und zwar werden ein Agarröhrchen (zum Anlegen einer Plattenkultur), zwei Bouillonröhrchen und ein Traubenzuckeragarröhrchen (hohe Schicht) mit je 5 Tropfen Serum beimpft. Die beimpften Nährböden müssen bei den zur Verwendung bei Menschen bestimmten Seris steril bleiben. Bei ausschließlich für Veterinärzwecke bestimmten Seris ist ein Keimgehalt bis zu 100 Keimen in 1 ccm zulässig, wenn die Sera sonst keine Zersetzungserscheinungen zeigen. Sorgsam arbeitende Fabriken liefern aber auch diese Sera keimfrei.

Weiterhin wird zur Prüfung des Phenolgehaltes einer Maus von 15 g 0,5 ccm Serum subkutan injiziert. Die Maus muß am Leben bleiben. Zeigt sie keine oder nur geringe Vergiftungserscheinungen (Zittern), so übersteigt die Menge des zugefügten Konservierungsmittels das zulässige Maß nicht.

Von jedem für die Anwendung beim Menschen bestimmten Serum verimpft man schließlich noch auf ein Meerschweinchen zur Prüfung auf Tetanustoxin bzw. etwaige vereinzelte Tetanuskeime 10 ccm Serum subkutan. Diese Prüfung erfolgt, um ähnlichen verhängnisvollen Zwischenfällen, wie sie früher im Auslande (Amerika, Italien) vorgekommen sind (Auftreten von Tetanus nach der Injektion von Diphtherieserum), vorzubeugen. Wenn das Meerschweinchen bis zum Abschluß der Wertbemessung des Serums gesund und munter bleibt, kann man mit Bestimmtheit annehmen, daß das Serum frei von den

genannten schädlichen Beimengungen ist. Es ist notwendig, zu diesen Versuchen völlig gesunde, noch nicht gebrauchte Tiere zu verwenden, da die bereits zu Wertbemessungszwecken benutzten Tiere im höchsten Grade gegen Serum überempfindlich sein können (Theobald Smithsches Phänomen, siehe R. Otto, 140).

Leider sind wir bisher nicht in der Lage zu prüfen, inwieweit ein Serum besonders geeignet ist, jene unliebsamen Nebenwirkungen hervorzurufen, die als „Serumexantheme" bekannt und zuerst von v. Pirquet und Schick (151, 152, 153) als Erscheinungen spezifischer Ueberempfindlichkeit analysiert und unter dem Namen „Serumkrankheit" zusammengefaßt sind. Es handelt sich hierbei um Hautausschläge der verschiedensten Art, die häufig mit lokalem Oedem, Gelenkschmerzen, Gelenkschwellungen, Fiebererscheinungen und sonstigen Allgemeinsymptomen einhergehen. Die Krankheitserscheinungen treten bei durchschnittlich 10 Proz. der mit Serum Behandelten teils sofort (innerhalb 24 Stunden) oder auch erst nach einer bestimmten Inkubationszeit auf und verschwinden fast immer ohne Hinterlassung dauernder Störungen. Sie werden allein von dem Serum als solchem und nicht etwa durch seinen Antitoxingehalt bedingt, denn die Stoffe, welche diese Nebenerscheinungen hervorrufen, sind auch im normalen Pferdeserum vorhanden. Gerade diese Erkenntnis ist für die Einführung der hochwertigen Sera maßgebend gewesen. Man sollte eben durch die Anwendung hochwertiger Sera in die Lage gesetzt sein, möglichst große Dosen Antitoxin in möglichst geringen Mengen Serum applizieren zu können.

Dieser Zweck konnte natürlich nicht dadurch erfüllt werden, daß man einfach durch Konzentration den Antitoxingehalt der Sera erhöhte. In diesem Falle würden ja gleichzeitig mit den Antitoxinen auch jene Stoffe konzentriert werden, die wir als Ursache der Serumkrankheit ansehen müssen und die sicher mit den Eiweißkörpern des Serums in Zusammenhang stehen. Aus diesem Grunde ist jede Eindickung des Serums unstatthaft. Es ist vorgeschrieben, alle bei Menschen zu verwendenden Sera auf ihren Eiweißgehalt zu untersuchen und solche Sera, die mehr als 12 Proz. Eiweiß enthalten, zu beanstanden.

Um auf die „Serumkrankheit" als solche nochmals zurückzukommen, so hat man die Beobachtung gemacht, daß scheinbar bei gewissen Serumnummern diese Erkrankungen häufiger auftreten, ohne daß aber alle mit dem betreffenden Serum behandelten Personen erkranken. Es muß sich also bei dem Agens dieser Erscheinungen um eine individuell verschieden stark toxisch wirkende Substanz im Serum der Tiere handeln, die bei hierzu disponierten Personen die Exantheme hervorruft. Man will ferner beobachtet haben, daß Erwärmen und Verdünnen der Sera die Intensität der Krankheitserscheinungen verringert und daß bei älteren (9—12 Monate) abgelagerten Seris die Serumexantheme kaum vorkommen. Inwieweit dies

zutrifft, läßt sich zurzeit noch nicht endgültig entscheiden; indessen sprechen Versuche von Otto und Höfer (143) und von Boehncke (28) an Meerschweinchen für die Richtigkeit der Ansicht, daß abgelagerte Sera weniger anaphylaktisch wirken, als frische.

v. Pirquet und Schick (l. c.) haben darauf hingewiesen, daß man bei der Serumkrankheit unterscheiden muß zwischen der Serumkrankheit Erstinjizierter und Wiederholtinjizierter. Besonders bei letzteren, bei denen die Erscheinungen meist schneller und stärker auftreten, konnten sie in der „sofortigen" oder „beschleunigten Reaktionsfähigkeit" ein wichtiges Kriterium für die Diagnose der Serumkrankheit feststellen, nachdem vorher v. Dungern (49) auf die Verkürzung der Inkubationszeit bei wiederholten Eiweißinjektionen hingewiesen hatte.

Während sich im Tierexperiment die höchsten Grade von Anaphylaxie mit tödlichem Ausgang leicht erzielen lassen (Otto, 140; Rosenau und Anderson, 157), sind beim Menschen ernstere schädliche Nebenwirkungen, die mit Sicherheit auf die Injektion von Heilserum zurückzuführen waren, offenbar bisher nur selten eingetreten. Gaffky und Heubner (68) haben in einem eingehenden, an die Wissenschaftliche Deputation für das Medizinalwesen erstatteten Gutachten über die Gefahren der Serumkrankheit bei der Schutzimpfung mit Diphtherieserum berichtet, daß in Deutschland in den Jahren 1903—1913, soweit bekannt geworden, nur 2 Fälle tödlich verliefen. Nach den Berichten der ausländischen Literatur sind aber mehrfach auch Todesfälle bei Personen, meist Erwachsenen, vorgekommen, die eine erste Seruminjektion erhielten, also früher noch nicht mit Serum behandelt waren. In diesen Fällen muß die Ueberempfindlichkeit demnach auf andere Weise zustande gekommen sein, wenn man nicht annehmen will, daß es sich um Personen mit einer angeborenen, isopathischen Disposition handelte. Dieser Annahme würde allerdings die Tatsache entsprechen, daß in manchen Fällen auch bei der Verwendung von Hammel- und Rinderserum anaphylaktische Erscheinungen auftreten können. Trotz dieser Möglichkeit erscheint aber die tunlichst weitgehende Verwendung von Rinder- (bzw. Hammel-)Serum für prophylaktische Zwecke, die zuerst von Jochmann (73) für Diphtherie empfohlen wurde, durchaus rationell und empfehlenswert. Der Gefahr, daß bei einer mit solchem Serum früher schutzgeimpften Person bei einer später therapeutisch gegebenen größeren Menge von Pferdeserum ernstere anaphylaktische Erscheinungen auftreten, ist jedenfalls viel geringer, als wenn auch schon zur Schutzimpfung Pferdeserum verwendet wurde.

Ob die Anaphylaxiegefahr durch Verwendung eines besonderen eiweißarmen Serums, wie es für Diphtherie bereits in den Handel gebracht wird, beseitigt werden kann, ist noch fraglich. In Tierversuchen, die Boehncke und Mouriz mit solchem Serum anstellten, waren die anaphylaktischen Erscheinungen zwar geringer als bei gewöhnlichem Diphtherieserum, sie blieben aber nicht ganz aus. Otto

und Höfer (143) fanden, daß ein von Blumenthal (Moskau) hergestelltes „gereinigtes“ Serum zwar in nicht höherem Grade, als natives Serum, anaphylaktischen Shock bewirkte, von einer Aufhebung der Toxizität für anaphylaktische Meerschweinchen konnte aber keine Rede sein. — Auf die Möglichkeit einer Prophylaxe der Serumkrankheit durch antianaphylaktische Seruminjektionen, auf die neuerdings Otto und Höfer (143) hingewiesen haben, soll hier nicht näher eingegangen werden.

II. Die Wertbemessung.

Neben der Prüfung auf Unschädlichkeit erfolgt gleichzeitig die Prüfung des spezifischen „Wirkungswertes“ der Sera. Diese Wertbemessung ist keine eigentliche „Eichung“, welche mit Hilfe der Prüfungsmethoden den genauen zahlenmäßigen Wert der Sera zu ermitteln hat, sondern sie hat nur zu prüfen, ob das zur staatlichen Prüfung eingesandte Serum mindestens den von der Fabrik angegebenen Wert hat. Minderwertige Sera werden demgemäß beanstandet, höherwertige dagegen zugelassen.

Grundbedingung für die exakte Wertbemessung eines Heilserums ist in jedem Falle eine quantitativ genau arbeitenden Wertbemessungsmethode. Diese Forderung zu erfüllen, ist bei einer Anzahl von Immunseris in völlig befriedigender Weise gelungen, wenn auch häufig erst nach Ueberwindung großer Schwierigkeiten. Besonders bedeutungsvoll für die ganze Entwicklung der Serumtherapie wurde die absolut exakte Wertbemessungsmethode für das Diphtherieserum, die wir Ehrlich (53) verdanken.

Bevor auf die Faktoren, die bei der Wertprüfung der einzelnen Sera in Betracht kommen, näher eingegangen wird, wollen wir einige allgemeine Bemerkungen vorausschicken.

Bekanntlich pflegen wir bisher nach ihrer Gewinnungsart und speziellen Wirkungsweise unter den Immunseris zwei verschiedene Typen, die „antitoxischen“ und die „antibakteriellen“ Heilsera zu unterscheiden. Während die antitoxischen Sera durch Immunisierung der Tiere allein mit den Giften der Bakterien gewonnen werden und daher nur mit solchen Bakterien erzeugt werden können, die in unseren Nährböden Gifte sezernieren, verwendet man zur Herstellung der antibakteriellen Sera die Leibessubstanzen der Bakterien. Es läßt sich experimentell zeigen, daß die Wirkungsweise eines Serums, das mit einer bestimmten Bakterienspezies gewonnen wird, direkt von der Art der Bakterienstoffe, welche zur Immunisierung verwandt werden, abhängig ist. Dies hat zuerst Wassermann (180) mit Kulturen des Bacillus pyocyaneus nachgewiesen. Je nachdem er Tiere mit der ganzen Kulturflüssigkeit oder allein mit den Leibessubstanzen des Bacillus pyocyaneus immunisierte, erhielt er ein antitoxisches Serum (das auch bakterizid wirkte), oder aber ein rein bakterizides Serum.

Nach ihrer Wirkungsweise unterscheiden sich die beiden genannten Serumarten dadurch, daß die antitoxischen Sera nicht direkt gegen die Bakterien selbst, sondern zunächst gegen die von ihnen sezernierten Gifte wirksam sind, und zwar dadurch, daß sie die Giftwirkung neutralisieren. Die antibakteriellen Sera dagegen sind imstande, die Bakterien selbst unschädlich zu machen. In welcher Weise dies geschieht und welche Stoffe im Serum die Träger der spezifischen Wirksamkeit sind, soll an anderer Stelle (S. 54 ff.) näher ausgeführt werden. Hier sei nur voraufgenommen, daß bei den verschiedenen Seris jedenfalls verschiedene Antikörper in Aktion treten [Bakteriolysine bzw. Bakteriotropine (Opsonine), Antiaggressine usw.] und daß die Schutz- und Heilwirkung dieser Sera in der Regel wohl auf dem Zusammenwirken mehrerer Faktoren beruhen dürfte.

Wenn auch in der Kenntnis der Wirkungsart der Immunsera in der neueren Zeit erhebliche Fortschritte gemacht worden sind, so haben wir doch bis heute über den Bau und die eigentliche Natur der in den Seris wirksamen Stoffe keine genaue Kenntnis, da es bisher nicht gelungen ist, diese Substanzen rein und frei von Serum darzustellen. Wir wissen von ihnen nur, daß sie an bestimmte Eiweißkörper des Serums gebunden sind, und sind im übrigen über ihre Natur auf Hypothesen angewiesen.

Von den zahlreichen Theorien, welche das Wesen und die Ursachen der Immunität zu erklären gesucht haben, hat keine eine so weitverbreitete Annahme gefunden, wie die von Ehrlich aufgestellte „Seitenkettentheorie“. (Näheres darüber siehe Ehrlich, 55, 56; Römer, 154; Aschoff, 4; Bruck, 37; Metschnikoff, 118.) Der Grundgedanke der Seitenkettentheorie ist in der Vorstellung Ehrlichs von der Ernährung des lebenden Protoplasmas, die er schon in seiner Arbeit „Ueber das Sauerstoffbedürfnis des Organismus“ im Jahre 1885 entwickelt hat, begründet. Ehrlich nimmt an, daß die Zelle befähigt ist, die verwandten Nährstoffe durch chemische Synthese mit bestimmten Seitenketten zu assimilieren, in ähnlicher Weise wie in der organischen Chemie bestimmte chemische Gruppen in die verschiedenen Atomgruppen (Seitenketten) am Benzolringe eintreten können. Nach seiner Anschauung kann man sich das lebende Protoplasma als aus einem Leistungskern und einer Anzahl von verschiedenen Rezeptoren bestehend denken. Diese Rezeptoren sollen die Träger ganz bestimmter Atomgruppierung darstellen und zu bestimmten Stoffen (den haptophoren Gruppen der Nährstoffe) eine maximale chemische Verwandtschaft haben. Sie passen zu diesen wie der „Schlüssel zum Schloß“. Nimmt man nun an, daß die Toxine gewisse haptophore Gruppen mit den Nährstoffmolekülen gemeinsam haben, so werden auch sie von den Rezeptoren verankert werden. Den durch diese Verankerung bedingten Defekt an Rezeptoren wird die Zelle nach dem Weigertschen Gesetz nicht nur vollständig ersetzen, sondern vielmehr durch Ueberregeneration überkompensieren. Diese Ueberregeneration, die bei der Immunisierung künstlich gesteigert werden kann, hat nun zur Folge, daß die überproduzierten Rezeptoren von der Zelle abgestoßen werden und in die Blutflüssigkeit gelangen. Diese frei im Blute zirkulierenden Rezeptoren sind die Antikörper. Nach dieser Theorie, die sich für den Ausbau der Immunitätslehre als außerordentlich wertvoll erwiesen hat, haben wir uns

also die Bildung der in den Seris wirksamen Stoffe (Antikörper) im Gegensatz zu den neuerdings wieder mehr in den Vordergrund tretenden Anschauungen, nach denen die Antikörper direkt aus den Antigenen entstehen sollen, als einen gesteigerten, rein physiologischen Prozeß vorzustellen. Die Antikörper selbst sind nichts anderes als Reaktionsprodukte (abgestoßene Rezeptoren) der lebenden Körperzelle, welche nach dem Weigertschen Gesetz im Uebermaß produziert wurden, um den durch die Giftzuführung usw. gesetzten Defekt zu kompensieren. Die fundamentale Bedeutung dieser Theorie liegt darin, daß sie zwanglos alle Eigenschaften der „Antikörper" erklärt, in erster Linie ihre streng spezifische Wirkung und ihr Vorkommen im normalen Serum.

Bestimmte Untersuchungsbefunde haben Ehrlich dazu geführt, drei verschiedene Arten von „Zellrezeptoren" anzunehmen, und zwar neben den einfach gebauten Rezeptoren erster Ordnung, die nur eine spezifische haptophore Gruppe besitzen, noch solche höherer Ordnung, welche die Zellen befähigen, hochmolekulare Eiweißstoffe zu verankern. Zur Assimilation derartiger Stoffe ist es nach Ehrlichs Ansicht zunächst erforderlich, daß sie durch fermentative Prozesse abgebaut werden. Dies geschieht einmal dadurch, daß diese Rezeptoren außer der haptophoren Gruppe noch eine zweite spezifische Funktionsgruppe besitzen, mit der sie auf das gefesselte Substrat einwirken, oder schließlich zwei haptophore Gruppen (Ambozeptoren) aufweisen, von denen die eine die Nährstoffe fesselt, während die zweite aus dem Blute gewisse fermentähnlich wirkende Stoffe bindet und in nahe räumliche Beziehung zu der zu assimilierenden Beute bringt.

Die Wirkung der Rezeptoren erster Ordnung hat man sich demnach einfach in der Weise vorzustellen, daß sie vermittels ihrer haptophoren Gruppe die haptophore Gruppe der Toxine besetzen. Die Rezeptoren zweiter Ordnung dagegen ergreifen zunächst mit Hilfe ihrer haptophoren Gruppe die haptophore Gruppe der Bakterien, dann erst tritt die spezifische Funktionsgruppe in Tätigkeit und ruft z. B. bei den Agglutininen das als Agglutination bekannte Phänomen hervor. Die Wirkungsweise der Rezeptoren dritter Ordnung verläuft schließlich in der Weise, daß sie mit ihrer zytophilen Gruppe sich mit der Zelle bzw. den Bakterien verbinden, während ihre zweite haptophore Gruppe (die komplementophile) das im normalen Serum vorhandene Komplement, in dem wir das eigentlich wirksame Prinzip bei der Lysinwirkung kennen, an sich reißt.

Bezüglich des Ortes, an dem die Antikörper entstehen, muß man nach Ehrlichs Lehre annehmen, daß alle bindungsfähigen Zellen des Organismus imstande sind, Antikörper zu produzieren. In erster Linie scheint aber die Antikörperbildung in den blutbildenden Organen vor sich zu gehen. Nach den Untersuchungen von Pfeiffer und Marx (150), Wassermann (181), Deutsch (44) u. a. werden die bakteriolytischen Ambozeptoren z. B. im wesentlichen im Knochenmark, in der Milz und in den Lymphdrüsen erzeugt. Die Untersuchungen von Castellani (39) und R. Kraus und Schiffmann (93) machen es wahrscheinlich, daß Präzipitine und Bakterienagglutinine in der Blutbahn gebildet werden. Weitere Untersuchungen von Römer (154), v. Dungern (49) und speziell von A. Wassermann und Citron (182, 183) weisen darauf hin, daß unter gewissen Umständen auch an anderen Stellen eine rein lokale Antikörperbildung zustande kommt.

Aus der großen Reihe der verschiedenen Antikörper, welche nach der Vorbehandlung mit Toxinen, Bakterien und sonstigen Antigenen im Tierkörper entstehen, den Präzipitinen, Antifermenten, Antitoxinen, Zytotoxinen,

Agglutininen und den verschiedenen Lysinen, interessieren uns speziell die Antitoxine, die zu den Rezeptoren erster Ordnung Ehrlichs gehören und die wirksamen Substanzen in den antitoxischen Heilseris darstellen, sowie die bakteriotropen und bakteriolytischen Antikörper, die zu der zweiten bzw. dritten Ordnung der Rezeptoren zu rechnen sind und die Träger der spezifischen Funktion der bakteriotropen und bakteriolytischen Sera bilden.

Im folgenden soll nur auf die Wertbemessung der verschiedenen, der staatlichen Kontrolle unterstellten Sera, ihre wissenschaftlichen Grundlagen und die zur Anwendung gelangenden prüfungstechnischen Maßnahmen ausführlicher eingegangen werden. Ueber die Möglichkeiten einer Wertbestimmung der sonstigen Heil- und Schutzsera sind in den folgenden allgemeinen Ausführungen einige Hinweise gegeben. Nähere Einzelheiten darüber sind in der Arbeit von R. Otto und K. H. Boehncke „Die Wertbemessung der Schutz- und Heilsera" im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und v. Wassermann (2. Aufl., Bd. 2, Jena, G. Fischer, 1913) zu finden.

a) Die Wertbemessung der Antitoxine.

Um den Wirkungswert eines antitoxischen Serums zu definieren, messen wir seinen Gehalt an Antitoxinen. Dazu vermischte v. Behring (9) anfangs das (Diphtherie-)Gift, und zwar in der einfach tödlichen Minimaldosis, mit dem (Diphtherie-)Antitoxin und brachte das Gemisch Meerschweinchen subkutan bei. Jedoch schon v. Behring und Boer (13, 14) betonten, daß für die vollständige Wertbemessung eines Serums vier Versuchsreihen anzustellen wären, die folgendes berücksichtigten:

1) den Immunisierungswert gegenüber einer Infektion,
2) den Heilwert gegenüber einer Infektion,
3) den Immunisierungswert gegenüber einer Intoxikation,
4) den Heilwert gegenüber einer Intoxikation.

Auf Grund seiner Untersuchungen konnte v. Behring den Satz aufstellen, daß ein unveränderliches Verhältnis zwischen diesen vier Werten besteht in dem Sinne, daß wenn man den einen derselben genau kennt, infolge des bestehenden Parallelismus Rückschlüsse auf die anderen drei gestattet sind. Demgegenüber behauptete Roux (159), daß konstante Beziehungen zwischen dem antitoxischen Wert eines Serums einerseits und dem präventiven und kurativen Wert andererseits in dem genannten Maße nicht beständen, sondern vielmehr bisweilen hochwertige Sera weit geringere heilende und schützende Eigenschaften besäßen als geringwertige. Zur Klärung dieser Fragen stellte Marx (110) mit Toxin und Antitoxin verschiedenster Stärke und wechselnder Herkunft umfassende Untersuchungen folgender Art an:

1) Heilversuche an Meerschweinchen: Gift subkutan, 3 Stunden später das Serum intraperitoneal;

2) Immunisierungsversuche an Meerschweinchen: intraperitoneale Einverleibung des Serums und nach 6 Stunden Subkutaninjektion des Toxins;

3) Heilversuche an Kaninchen: Gift und — nach verschiedenen Zeiten — Antitoxin intravenös;

4) Immunisierungsversuche an Kaninchen: intravenöse Injektion des Antitoxins und unmittelbar darauf des Toxins.

Dabei zeigte sich, daß die toxinneutralisierende Kraft eines Diphtherieheilserums (d. h. sein Gehalt an Antitoxineinheiten) und die immunisierende und heilende Wirkung drei Faktoren sind, die in engster Beziehung stehen, und zwar so, daß der Immunisierungs- und Heilwert eines Serums dem Gehalt an Immunitätseinheiten direkt proportional ist.

War man also hiernach berechtigt, die Wertbemessung der antitoxischen Sera allein durch Feststellung ihres Gehaltes an Immunitätseinheiten vorzunehmen, so schienen dem wieder die Ergebnisse Cruveilhiers (41) zu widersprechen, der nach einer Reihe ähnlicher Versuche, jedoch unter Verwendung lebender Diphtheriekulturen, den Anschauungen Roux' entsprechend zu einem wesentlich anderen Resultat kam, nämlich daß der heilende Effekt eines Serums nicht ausschließlich von dessen Gehalt an Antitoxineinheiten abhängig sei und daß daher die übliche Titrationsmethode kein exaktes Maß für die Brauchbarkeit und Leistungsfähigkeit eines Serums sei. Wenn also für ein Serum ein hoher Antitoxingehalt auch erwünscht sei, so sollte dies keineswegs die Hauptsache sein, vielmehr der Haupteffekt anderen im Serum wirksamen Stoffen zukommen.

Die Ergebnisse Cruveilhiers wurden arg erschüttert durch die Versuche von Steinhardt und Banzhaf (172), die, mit der gleichen Methodik wie der französische Autor arbeitend, zu ganz entgegengesetzten Resultaten kamen, nämlich daß der Heilwert des Serums von dem Antitoxingehalt abhängig ist. Die Streitfrage kam aber bald wieder in Fluß, als Kraus und Schwoner (94) im Jahre 1908 in ihrer Arbeit „Ueber Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu dessen Heilwert" ihre Untersuchungsergebnisse in folgenden Sätzen formulierten:

1) Zwischen Antitoxinmengen und Heilwert des Diphtherieserums bestehen keine fixen Beziehungen;

2) dem hochwertigen (300—600-fachen) Diphtherieserum kommt in der Regel geringere Heilwirkung zu als solchem, welches geringerwertig ist;

3) der Heilwert eines Serums, i. e. Avidität, scheint von der Zu- oder Abnahme der Antitoxinmenge während der Immunisierung unabhängig zu sein;

4) Die Avidität der antitoxischen Sera ist eine prinzipielle Eigenschaft des Antitoxins und soll bei der Wertbemessung berücksichtigt werden;

5) die bisherige Wertbestimmung nach Ehrlich zeigt in ausgezeichneter Weise die Menge der Antitoxine an, berücksichtigt aber nicht den Heilwert.

In Uebereinstimmung mit Belfanti (19) konnte Berghaus (20) auf Grund seiner in drei Arbeiten niedergelegten Befunde die Sicherheit der Ehrlichschen Wertbemessungsmethode von neuem bestätigen. Er stellte seine Versuche zum Teil mit denselben Seris wie Kraus an, wählte aber nicht wie dieser die subkutane Methode der Gift- und Serumeinverleibung, sondern zunächst nach dem Vorgang von Morgenroth die intrakardiale Gift- und Serumeinspritzung. Konnte er zunächst den alten Satz wieder bestätigen, „daß für die Heilwirkung nicht die Herkunft der Sera, noch ein anderes Moment, sondern nur ein Faktor in Betracht kommt, und zwar der Gehalt an Antitoxineinheiten", so glaubte er aus seinen experimentellen Resultaten weiter die Folgerung ziehen zu dürfen, daß für die Prüfung der Frage der Aviditätsverhältnisse des Toxins und Antitoxins die Subkutanmethode, weil zu unzuverlässig, besser nicht in Anwendung gezogen wird. Da er fand, daß eine Stunde nach der Injektion derselben Giftmenge

bei der subkutanen Injektion	40,0	IE.
bei der intraperitonealen Injektion	7,0	IE.
bei der intrakardialen Injektion	0,08	IE.

zur Heilung nötig waren, so ergab sich daraus die bedeutsame Tatsache, daß die Heilwirkung des Serums bei direkter Einverleibung in die Blutbahn 500mal größer als bei der subkutanen und noch 80 bis 90mal größer als bei der intraperitonealen Injektion war.

Eine weitere Widerlegung fanden die Versuchsresultate von Kraus und Schwoner durch die entgegengesetzten Ergebnisse der unter Kolles Leitung durchgeführten Untersuchungen Brüstleins (38). Dieser fand eine absolut wie relativ stärkere Heilkraft der Hochwertsera im Vergleich zu entsprechenden Quantitäten niederwertiger Sera, da er bei ersteren mit absolut weniger Antitoxineinheiten als bei letzteren genau denselben Effekt erzielen konnte.

Auch Neufeld und Händel (130) konnten bei ihren Versuchen über den Zusammenhang von Heilwert und Antitoxingehalt die Ergebnisse von Kraus und Schwoner nicht bestätigen. Sie benutzten zu ihren Untersuchungen vier von Kraus überlassene Sera, die einen Wertgehalt von 70 bzw. 95 bzw. 140 bzw. 310 IE. in 1 ccm hatten. Wie sich zeigte, ließ sich mit derselben Antitoxinmenge bei allen 4 Seris der gleiche Heileffekt erzielen.

Allerdings weisen Neufeld und Händel, besonders auf Grund

der Befunde von LINDEMANN (101) (ferner desgleichen von BANDI, MENABUONI, TUNICLEFF, v. GRUBER und OHKUBO) bezüglich der phagozytären Wirkung nach der Simultanmethode erzeugter Diphtheriesera auf die auch von LINDEMANN betonte Notwendigkeit hin, eventuell auch die bakteriotrope Wirkung der Diphtheriesera zu prüfen. Da auch Angaben von MARTIN, PREVOT und LOISEAU (109) vorliegen, die eine anscheinend bessere Wirkung antibakterieller Diphtheriesera nicht unwahrscheinlich machen, so könnte im Falle anderweitiger Bestätigung dieser Angaben allerdings vielleicht einmal auch die weitere Wertbemessung dieser Sera hinsichtlich ihres Gehaltes an Bakteriotropinen und Immunopsoninen für spätere Zeit in Frage kommen.

KRAUS vertritt auch in seinen neuesten Veröffentlichungen (88, 89) noch den Standpunkt, daß Antitoxingehalt und Heilwert des Diphtherieserums sich gegenseitig nicht entsprechen und daß für den letzteren in erster Linie die Avidität der Antitoxine maßgebend sei. Demgegenüber haben KOLLE und SCHLOSSBERGER (84, 85) nochmals durch umfangreiche Untersuchungen in unzweideutiger Weise bewiesen, daß die alte EHRLICHsche Anschauung zu Recht besteht und somit auch die auf ihr aufgebaute Wertbemessung des Serums durchaus einwandfrei ist. KOLLE und SCHLOSSBERGER stellten, um den natürlichen Verhältnissen beim diphtheriekranken Menschen näher zu kommen, im Gegensatz zu den meisten Autoren, die bei ihren Heilversuchen den Versuchstieren fast ausschließlich keimfreie Bouillongifte und dann, nach Ablauf einer bestimmten Zeit, Serum injizierten, auch zahlreiche Heilversuche bei Meerschweinchen an, die mit lebenden Diphtheriebazillen in verschiedenen Dosen subkutan oder perkutan (Einreiben der Bakterien auf die rasierte Bauchhaut) infiziert worden waren. Dabei ergab sich, daß das antitoxische Diphtherieheilserum, das mittels keimfreier Bouillongifte eines oder mehrerer Stämme hergestellt wird, nicht nur gegenüber der Diphtherievergiftung der Meerschweinchen mit den in vitro hergestellten Toluolgiften einer großen Anzahl verschiedener Stämme, sondern auch bei der Infektion der Tiere mit lebenden Bakterien sämtlicher geprüfter Kulturen Heilwirkung entfaltet. Diese Heilkraft des Diphtherieserums geht parallel seinem Antitoxingehalt und ist um so stärker, je früher nach der Injektion des Giftes bzw. der Bakterien die Anwendung des Heilserums erfolgt. Je größer das Zeitintervall ist, um so größere Antitoxinmengen müssen angewendet werden, um noch eine Wirkung zu erzielen. Es gibt, wie DÖNITZ dies auch für das Tetanusgift festgestellt hat, einen nach der Größe der Infektionsdosis verschiedenen Zeitraum, bei dem es auch bei Anwendung größter Dosen hochwertigen (1000-fachen) Heilserums nicht mehr gelingt, den Tod der mit lebenden Diphtheriebazillen infizierten Meerschweinchen zu verhindern. Daß die von den Diphtheriebazillen im Tierkörper gebildeten Toxine in der Tat mit den in vitro sezernierten

Giften identisch sind, konnte auch noch dadurch nachgewiesen werden, daß der Heilwert der Sera von Pferden, die mit lebenden Diphtheriebazillen (von Löfflerserum-Kulturen) eines Stammes immunisiert worden waren, ihrem nach der EHRLICHschen Methode bestimmten Antitoxingehalt entsprach. Die von ROUX und seiner Schule vertretene Auffassung, daß die Diphtheriebazillen nicht nur durch ihr Toxin, sondern auch noch durch ihre sonstigen Lebensäußerungen oder durch ihre Leibessubstanz (Endotoxine) krankmachend wirken, ist dadurch wohl endgültig widerlegt.

Die von BINGEL (24) aufgestellte Behauptung, daß auch dem normalen Pferdeserum heilende Wirkungen gegenüber der Diphtherieinfektion zukämen und daß es bei der Behandlung Diphtheriekranker annähernd dasselbe leiste, wie hochwertiges antitoxisches Diphtherieserum, sei hier nur kurz erwähnt. Sie ist nicht nur vom experimentell-therapeutischen Standpunkt aus unter anderen durch die bereits erwähnten Untersuchungen von KOLLE und SCHLOSSBERGER (85), sondern auch von zahlreichen Klinikern auf Grund der Erfahrungen am Krankenbett scharf zurückgewiesen worden.

Die Ermittelung des Antitoxingehaltes bietet bei den rein antitoxischen Seris keine weiteren Schwierigkeiten, da wir durch die grundlegenden Arbeiten EHRLICHS und v. BEHRINGS sowohl die Konstitution der Gifte als auch die Bindungsverhältnisse zwischen Toxin und Antitoxin überschauen. Speziell EHRLICH (51) konnte bei seinen Untersuchungen über die Beziehungen des Rizins zum Antirizin durch Einführung des Reagenzglasversuches zeigen, daß Gift und Gegengifte sich chemisch vereinigen, ohne daß vitale Kräfte dabei mitwirken, und daß es sich bei dieser Bindung von Toxin-Antitoxin nicht um eine Zerstörung des ersteren handelt, was besonders klar die späteren Versuche MORGENROTHS und seiner Mitarbeiter (121 a) gezeigt haben, sondern daß eine ganz neue und ungiftige Verbindung dabei entsteht. Weitere Untersuchungen von MORGENROTH (121), OTTO und SACHS (144) machten die bereits von v. BEHRING aufgestellte Hypothese wahrscheinlich, daß man bei der Vereinigung Toxin-Antitoxin wohl auch mit katalytischen Einflüssen (in dem Subkutangewebe bzw. dem Serum selbst) zu rechnen hat.

ARRHENIUS und MADSEN (2), welche gegenüber der EHRLICHschen Vorstellung von der komplexen Konstitution des Diphtheriegiftes (siehe S. 66) die Anschauung vertraten, daß die Toxine in frischem Zustande einheitliche Substanzen sind, nahmen an, daß der Reaktionsverlauf zwischen Gift und Gegengift sich, dem Massenwirkungsgesetz folgend, nach dem Typus der Salzbildung aus schwachen Säuren und ebensolchen Basen abspielt.

Durch genaue quantitative Analyse des „DANYZschen Phänomens" hat aber v. DUNGERN (50) gezeigt, daß sich die Bindungserscheinungen

zwischen Toxin und Antitoxin nicht nach dem GULDBERG-WAGEschen Gesetz, sondern nur durch die komplexe Konstitution der Toxine erklären lassen. Näheres darüber s. LEVADITI (100a).

MENTZ VON KROGH (117) hat die Frage der Bindung von Toxin-Antitoxion durch genaue quantitative Messungen mit physikalisch-chemischen Methoden studiert und festgestellt, daß die Bindung von Diphtherietoxin und -antitoxin in ihren ersten Stadien eine Adsorptionsbindung ist. Dabei führt die Adsorption des Toxins an und für sich, sei es an Antitoxin oder andere Stoffe, nicht zu einer Entgiftung des Toxins. Diese findet vielmehr erst nachträglich durch eine chemische Bindung statt, die spezifisch ist und beispielsweise für das Diphtherietoxin und -antitoxin bei Zimmertemperatur eine halbe Stunde in Anspruch nimmt. RUSZNYÁK (162) hält die Toxine für Fermente und nimmt an, daß die Antitoxine spezifische Spaltungsprodukte sind, wodurch sämtliche Gesetzmäßigkeiten der Toxin-Antitoxinverbindungen eine einheitliche Erklärung fänden und die Erscheinungen der Antitoxinbildung und Spezifität einer chemischen Deutung zugänglich würden.

M. ARTHUS und B. STAWSKA (3) fanden die Schlangengifte und -gegengifte besonders geeignet zum Studium der Bindungsvorgänge zwischen Toxin und Antitoxin. Sie konnten entgegen der Behauptung von MARTIN und CHERRY (108), daß die Bindung Toxin-Antitoxin ein allmählich fortschreitender, ziemlich langsamer, an die diastatischen Reaktionen erinnernder Vorgang sei, zeigen, daß die neutralisierende Wirkung des Antitoxins auf das spezifische Toxin eine augenblickliche ist.

Zur Bestimmung der antitoxischen Wirkungskraft eines Serums, d. h. zur Messung seines Gehaltes an Antitoxinen, bedarf man zunächst eines einheitlichen und konstanten Maßstabes. Hierzu dient die „Immunitätseinheit" (Antitoxineinheit). Schon v. BEHRING (10, 11) hatte eine solche zur Messung verschiedener Antitoxinlösungen geeignete Maßeinheit in seinem „Tetanusnormalserum" eingeführt („1 ccm Tetanusnormalserum sollte den zur Erreichung eines Heileffektes bei weißen Mäußen erforderlichen Mindestgehalt an Antitoxin enthalten"). Auch für das Diphtherieheilserum prägte er in ähnlicher Weise ein „Normalheilserum" als Maßeinheit. Später wurden diese Begriffe von v. BEHRING und EHRLICH weiter entwickelt und als Immunitäts- oder Antitoxineinheit die in 1 ccm des Normalheilserums enthaltene eine Immunisierungseinheit bezeichnet; 0,1 ccm dieses Normalserums genügten zur Neutralisation von 1 ccm des v. BEHRINGschen „Normalgiftes" (von dem 1 ccm genau 100 einfach tödliche Dosen darstellte).

Handelte es sich zunächst also um auf gewisse „Normal"begriffe zurückgeführte Maßeinheiten, so ist die jetzt in der Prüfungstechnik gebrauchte Immunitätseinheit eine willkürliche Größe und so entstanden, daß EHRLICH eine bestimmte (an sich beliebige) Menge Antitoxin als Einheit bezeichnete, welche von einem damals zur Verfügung stehenden Gift 100 tödliche Dosen so absättigte, daß nach Injektion dieses Gemisches auch nicht die geringste Spur von Krankheit (lokaler und allgemeiner Reaktion) eintrat. Als Träger der Maßeinheit dient das Antitoxin, weil sich das labilere Toxin dazu als ungeeignet erwies. Es galt also die Konstanz des Antitoxins auf das minutiöseste zu bewahren, was nur durch völligen Ausschluß aller schädigenden, zersetzenden Faktoren als Wasser, Licht, Wärme und Sauerstoff geschehen konnte. Einmal verändert oder verloren, war der Maßstab unbrauchbar bzw. unersetzlich und die Grundbedingung einer exakten Wertbemessung der antitoxischen Heilsera vernichtet. Aehnlich wie also unsere internationale Längeneinheit, das Metermaß, in Paris unter

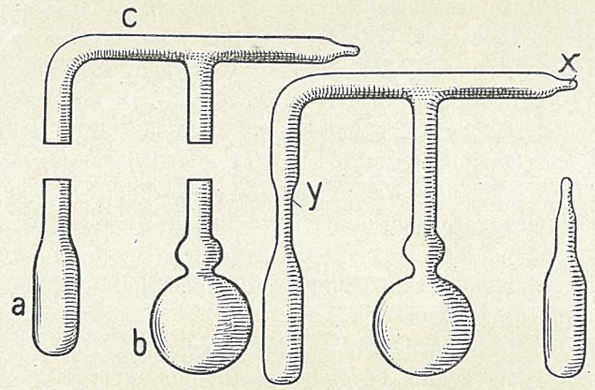

Fig. 2.

den umfassendsten Vorsichtsmaßregeln aufbewahrt wird, wird in Frankfurt im Institut für experimentelle Therapie (als der amtlichen Prüfungsstelle) mit allen zu Gebote stehenden Mitteln für die absolute Unveränderlichkeit der Serummaßstäbe, d. h. der Immunitätseinheiten, Sorge getragen. Diese Mittel sind an die Hand gegeben durch die von EHRLICH zunächst für das Diphtherie-Standardserum ausgearbeitete und später in die prüfungstechnische Praxis allgemein eingeführte Methode der Serumkonservierung.

Die Konservierung in EHRLICHschen Vakuumapparaten (53, 58, 111), die sich nicht nur für größere wie auch kleinste Serummengen, sondern auch für Gifte eignet, wird folgendermaßen ausgeführt:

Genau gleiche Mengen der flüssigen Sera werden mit Präzisionspipetten in sterilisierte Serumröhrchen von bestimmter Form (Fig. 2*a*) eingefüllt. Es dürfen nur völlig native Sera ohne irgendwelchen Zusatz benutzt werden. Die Serumröhrchen bilden Teile eines Röhrensystems,

zu dem noch ein Kölbchen *b*, das zur Aufnahme von Phosphorsäureanhydrid dienen soll, und ein Verbindungsstück *c* gehört. Nachdem das eingefüllte Serum im Exsikkator getrocknet ist, werden die einzelnen Stücke des Röhrensystems in der aus Fig. 2 ersichtlichen Anordnung aneinander geschmolzen und zur weiteren vollständigen Evakuierung eine Anzahl solcher Apparate mit einer Quecksilber-Luftpumpe in Verbindung gebracht (Fig. 3). Unter dem Einfluß des Vakuums wird das Wasser, welches bei der gewöhnlichen Exsikkatorvortrocknung noch bis zu 10 Proz. in den Trockenseris enthalten sein kann, schnell durch das Phosphorsäureanhydrid absorbiert und zugleich mit dem Sauerstoff entfernt. Man schmilzt dann bei *x* ab und läßt die mit den Phosphorsäureanhydridkölbchen noch verbundenen Serumröhrchen etwa 2—3 Monate stehen. In dieser Zeit wird das Phosphorsäureanhydrid wiederholt leicht aufgeschüttelt, damit immer eine völlig trockene Oberflächenschicht die letzten Wasserreste aufsaugen kann. Erst dann, wenn bei vorsichtigem Beklopfen der Kölbchen das aufgeschüttelte Anhydrid völlig unverändert bleibt, werden die Serumröhrchen bei *y* abgeschmolzen. Das Serum befindet sich nunmehr unter Bedingungen, die, wie die Erfahrung gezeigt hat, für die Konservierung die bei weitem geeignetsten sind. An einem dunklen, kühlen Orte aufbewahrt, hält sich das Serum so jahrelang unverändert. Es ist nicht vorteilhaft, die Absorption des Wassers bei erhöhter Temperatur erzwingen zu wollen, vielmehr scheint hierzu die geeignete Temperatur die Zimmertemperatur zu sein.

Soll Trockenserum für Standardzwecke verarbeitet werden — was für die Prüfungstechnik besonders empfehlenswert ist — so müssen unbedingt alle Fehlerquellen ausgeschaltet werden, die durch schlechte Löslichkeit auch nur der geringsten Mengen des Serumpulvers entstehen können. Eine einigermaßen sichere, gleichmäßige Löslichkeit kann nur von den mittelgroßen, scholligen Anteilen des Trockenserums erwartet werden. Man tut deshalb gut, das Trockenserum zunächst in einem Mörser zu zerstoßen und dann durch ein doppeltes Serumsieb zu geben, das durch ein oberes grobes Sieb die größeren Bröckel und die von der Oberfläche des eingetrockneten Serums stammenden, schwer löslichen, dünnen größeren Blättchen zurückhält, während durch das untere feinere Sieb die ebenfalls schlecht löslichen pulverisierten Bestandteile ausfallen. Nur die auf dem feineren Sieb zurückbleibenden scholligen Teile des Trockenserums sind zu verwenden. Aber auch dann, wenn nur von diesen letzteren auf der chemischen Wage exakt abgewogene gleiche Mengen in den Serumröhrchen nach Evakuierung eingeschmolzen werden, hat man nicht die Gewähr, daß bei späterer Lösung der Inhalt aller Gläschen absolut gleichwertige Lösungen ergibt. Diese Fehlerquelle kann man, wenn auf die spätere genaue Einstellung jeder einzelnen Lösung verzichtet werden soll, nur dadurch umgehen,

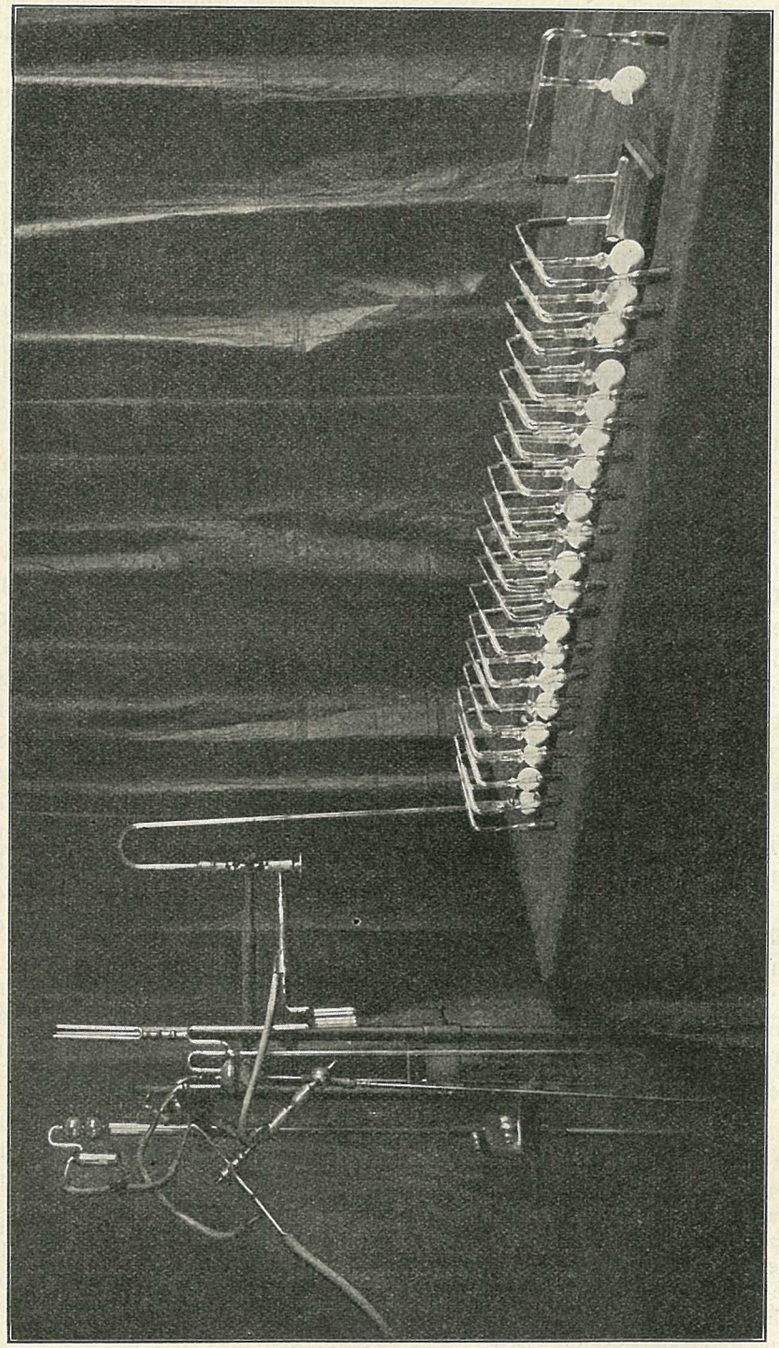

Fig. 3.

daß man das Trockenserum vor der Einfüllung wieder bis etwa zur Konzentration des nativen Serums löst und dann in flüssigem Zustande in der oben beschriebenen Weise weiterbehandelt.

Von der gleichen praktischen Wichtigkeit, wie die Konservierung, ist natürlich auch die absolut genaue Fortführung der Maßeinheit bei der Einstellung eines neuen Standardserums, wenn das ursprüngliche Serum zu Ende geht. Da hierbei jede Verschiebung der Maßeinheit zu vermeiden ist, kommt es darauf an, daß das neue Serum absolut genau auf das alte Serum eingestellt wird. Um sich vor unangenehmen Ueberraschungen zu schützen, muß man bei der Neueinfüllung eines Serums zu Standardzwecken vor allem daran denken, daß das Serum durch die einzelnen Akte der Evakuierung nicht unerhebliche Verluste an spezifischer Wirksamkeit erleiden kann. Aus diesem Grunde ist es absolut notwendig, die endgültige Einstellung erst dann vorzunehmen, wenn das Serum bereits eingefüllt und evakuiert ist.

Man verfährt daher bei der Einführung eines neuen Standardserums — als Beispiel diene ein Diphtherie-Standard-Trocken-Serum — am besten folgendermaßen:

Man läßt sich von einer Serumfabrik einen größeren Vorrat (etwa 500 g) von karbolfreiem Trockenserum kommen, zerkleinert es in sterilem Mörser und siebt es, wie oben besprochen. Der brauchbare Anteil wird in einem sterilen Glase mit eingeschliffenem Stopfen aufbewahrt. Man überzeugt sich nun, nachdem man eine geringe Menge (etwa 0,2 g) gelöst hat, durch eine in der üblichen Weise ausgeführte Prüfung von dem ungefähren Wert des Serums. Nehmen wir an, das Trockenserum sei nach Angabe der Fabrik 5000—6000-fach gewesen (1 g Trockenserum entspricht ungefähr 10 ccm nativem Serum) und bei dieser Vorprüfung habe es sich in der Tat als etwa 6000-fach erwiesen. Dann wird das gebrauchsfähige Trockenserum in genauestens abgewogenen Mengen — 2 g — in Serumröhrchen eingefüllt[1]) und in der früher geschilderten Weise evakuiert und nach längerer Lagerung über Phosphorsäureanhydrid eingeschmolzen.

Erst, wenn die Vakuumröhrchen ganz fertiggestellt sind, wird zur genaueren Einstellung des Serumwertes geschritten. Man öffnet hierzu ein Röhrchen, löst seinen Inhalt (2 g) in 120 ccm Glyzerin-Kochsalzlösung[2]) (vgl. S. 70) und stellt diese frische Lösung, die in

1) Eine Auflösung des Trockenserums, wie sie oben empfohlen wurde, ist hier unnötig, weil es sich um größere Mengen handelt und die aus dem Inhalt der Vakuumröhrchen hergestellte Lösung des Diphtherie-standardserums jedesmal genau eingestellt wird.

2) Man benutzt hierzu Glyzerin-Kochsalzlösung, weil diese — im Gegensatz zu gewöhnlicher Kochsalzlösung — längere Zeit steril bleibt und die Antitoxine unverändert läßt. Es kann also für alle erforderlichen Einzeleinstellungen (s. Tabelle 1) dieselbe Ausgangslösung verwendet werden. Die weiteren Verdünnungen sind jedesmal frisch herzustellen.

jedem Kubikzentimeter also etwa 100 IE. enthalten müßte, gegenüber der Testgiftdosis, die bei den Prüfungen mit dem alten Standardserum benutzt wurde, allmählich ein, wie es Tabelle 1 zeigt. Man prüft also zunächst in „groben Schlägen“ und stellt dann, wenn man sich von dem Ergebnis durch 4-tägige Beobachtung der Versuchstiere überzeugt hat, durch immer engeres Zusammenrücken der in Betracht kommenden Serumverdünnungen fest, bei welcher Verdünnung der Tod der Tiere regelmäßig spätestens am 4. Tage eintritt. In unserem Falle war dies bei der 5925-fachen Verdünnung des Trockenserums der Fall.

Der genau eingestellte Grenzwert wird dann umgekehrt noch unter gleichzeitiger Variierung der Giftdosis kontrolliert. Tabelle 2, aus der die Versuchsanordnung für diese endgültige Feststellung des Wertes des neuen Standardserums ersichtlich ist, zeigt, daß das Trockenserum gegenüber 0,13 ccm Testgift genau 5925-fach ist.

Tabelle 1.
Einstellung des neuen Standardserums mit der Testgiftdosis 0,13.

Verdünnung	I 18. 10.	II 22. 10.	III 27. 10.	IV 1. 11.	V 6. 11.	VI 11. 11.	VII 16. 11.	VIII 20. 11.	IX 25. 11.	X 30. 11.
4500	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5000	0	0	.	.	.	.	.	.	.	.
5500	0	0	.	.	.	.	.	.	.	.
5750	.	0	0	0	.	.	.	.	.	.
5800	.	.	† 4½ *)	0	0	.	.	.	.	.
5900	.	.	0	0	0	0	0	† 4½	0	.
5910	.	.	.	.	.	0	.	0	† 4½	0
5920	.	.	.	.	.	0	† 4½	0	† 4	† 4½
5925	.	.	.	.	† 4	.	† 3	† 4	† 4	† 4
5930	.	.	.	.	.	† 4	† 3	† 3	† 3	† 4
5940	.	.	.	.	.	† 3	† 3	.	.	.
5950	.	.	† 3½	† 3	† 3	† 3	.	.	.	.
6000	† 2	† 2½	† 3	.	.	.	.	.	.	.
6500	† 2	† 1½	.	.	.	.	.	.	.	.

*) † 4½ = tot nach 4½ Tagen.

Tabelle 2.
Endgültige Feststellung des Wertes des neuen Standardserums.

Testgiftdosis	am 6. 12.		am 12. 12.	
	als 5920-fach	als 5925-fach	als 5925-fach	als 5930-fach
0,12	0	0	0	0
0,125	0	0	0	† 4
0,13	0	† 4	† 4	† 4
0,135	0	† 4	† 3	† 3

Als Prüfungsgift könnte man natürlich jedes beliebige Diphtherietoxin verwenden. Dabei wäre aber, da in mehrfachen Vergleichsreihen einerseits die Standardeinheit und andererseits beliebige Verdünnungen des Probeserums mit steigenden Toxindosen ausgewertet werden müßten, ein recht großer Verbrauch an Versuchstieren un-

umgänglich. Man benutzt daher in der Praxis die Erfahrung, daß Gifte in ihren prüfungstechnischen Eigenschaften eine gewisse Zeit konstant bleiben. Beim Diphtheriegift ist dies schon bei der Konservierung in der gewöhnlichen Form (unter Toluol) der Fall, sobald nur erst die Gifte „abgelagert“ sind; beim Tetanustoxin ist dagegen eine Konservierung nur im trockenen Zustande möglich. Solche konstant bleibenden Gifte bezeichnet man als Standardtoxine. Mit diesen Standardgiften kann man in größeren Tierserien ein für allemal folgende Werte (Ehrlich, 53) genau festlegen:

1) die einfach tödliche Dosis, der die Tiere am 4. Tage erliegen,

2) diejenige Dosis, welche 1 IE. genau sättigt, d. h. nach welcher die Tiere am 4. Tage glatt sind, aber bei der 48 Stunden nach Injektion des Toxin-Antitoxingemisches vorgenommenen Tötung eine minimale, gerade noch sichtbare lokale Reaktion an der Injektionsstelle aufweisen — dieser Wert wird als L_0 (Limes 0 = vollkommene Neutralisation) bezeichnet (vgl. S. 73) — und

3) diejenige Dosis, bei der nach Zusatz von 1 IE. noch so viel Gift im Ueberschuß vorhanden ist, daß die Meerschweinchen am 4. Tage (ausnahmsweise am 3. und 5. Tage) an der Giftwirkung zugrunde gehen, d. h. die eine einfach tödliche Dosis im Ueberschuß enthält — dieser Wert wird als $L_{\dagger}$ (Limes † = tödlicher Giftüberschuß) bezeichnet —.

Bei der jetzigen Methode der Prüfung der antitoxischen Sera wird auf den $L_{\dagger}$-Wert eingestellt. Vom theoretischen Standpunkt aus könnte aber ebensogut natürlich der L_0-Wert als Prüfungsdosis herangezogen werden; das hat sich in der Praxis aber weniger bewährt (vgl. S. 66).

Ist die Prüfungsdosis, die $L_{\dagger}$-Dosis, bei einem Gifte einmal festgelegt, so hält sie sich in der Regel viele Monate lang unverändert.

Tabelle 3 enthält eine Zusammenstellung aller bisherigen Diphtherie-Testgifte mit Angabe der Prüfungsdosen. Im ganzen wurden seit 1897, also seit Einführung der neuen Ehrlichschen Prüfungsmethode, 15 Gifte als „Prüfungsgifte“ benutzt. Die Prüfungsdosis ($L_{\dagger}$-Dosis) schwankte bei den einzelnen Giften zwischen 0,13 und 0,79 ccm und blieb meist recht lange unverändert, so z. B. bei dem Gift 13 über 3 Jahre und bei Gift 14 4 Jahre lang. Aus der Tabelle ist ferner ersichtlich, daß man in einzelnen Fällen (Gift 1, 4, 7, 8 und 9) genötigt war, die Prüfungsdosis nach einigen Monaten zu ändern, da sich das Gift — wenn auch in geringem Grade — noch nach der Einstellung als Testgift abschwächte.

Im Vorhergehenden sahen wir bereits, daß man außer den beiden konstanten Maßstäben Standardtoxin und -antitoxin noch eines Indikators bedarf, an dem man den Grad der erfolgten Neutralisierung von Gift und Gegengift ablesen kann.

Man bedient sich hierzu in der Praxis des Tierkörpers. Natürlich ist es nötig, für die einzelnen Toxine Spezies von ganz gleichmäßiger Empfänglichkeit bzw. Resistenz herauszufinden. Für unsere wichtigsten antitoxischen Sera ist diese Voraussetzung erfüllt, da wir

Tabelle 3.

Testgift Nr.	im Gebrauch			Prüfungsdosis war	
	von?	bis?	mithin wie lange?	wie hoch?	wie lange?
1	April 1897	Oktober 1897	7 Monate	a) 0,355 ccm b) 0,36 „	5 Monate 2 „
2	November 1897	„ 1898	12 „	0,5 „	12 „
3	„ 1898	August 1899	10 „	0,79 „	10 „
4	September 1899	Januar 1901	17 „	a) 0,5 „ b) 0,51 „	3 „ 14 „
5	Februar 1901	Oktober 1901	9 „	0,45 „	9 „
6	November 1901	September 1902	11 „	0,26 „	11 „
7	Oktober 1902	Dezember 1903	15 „	a) 0,77 „ b) 0,78 „	3 „ 12 „
8	Januar 1904	August 1905	20 „	a) 0,38 „ b) 0,395 „	6 „ 14 „
9	September 1905	November 1908	19 „	a) 0,27 „ b) 0,29 „	7 „ 12 „
10	April 1907	November 1908	19 „	0,365 „	19 „
11	Dezember 1908	Juni 1910	18 „	0,63 „	18 „
12	Juni 1910	September 1912	26 „	0,39 „	36 „
13	Oktober 1912	November 1915	37 „	0,25 „	37 „
14	Dezember 1915	Dezember 1919	48 „	0,32 „	48 „
15	seit Dezember 1919	—	—	0,13 „	bisher 18 Mon.

im Meerschweinchen für das Diphtheriegift und in der Maus (bzw. dem Kaninchen) für das Tetanus- und Dysenteriegift Tiere von hoher gleichmäßiger Empfänglichkeit besitzen. Es kommt zwar vor, daß bei Reihenversuchen einzelne Tiere infolge einer besonderen indididuellen Empfindlichkeit oder einer besonderen individuellen Resistenz „ausfallen“, d. h. innerhalb der regelrechten Reihe entweder sterben oder am Leben bleiben. Ein derartiges Vorkommnis kann aber den Allgemeineindruck des Ergebnisses nicht beeinträchtigen, wenn die Reihen weit genug angesetzt sind und genügend Wiederholungen zeigen (vgl. z. B. Tabelle 6 auf S. 72).

Anderen Giften gegenüber ist aber die Empfänglichkeit unserer Versuchstiere durchaus nicht immer gleich. Bei dem Crotin z. B. finden sich alle möglichen Differenzen insofern, als das eine Tier unempfindlich und das andere hochempfindlich ist. Ein Gemisch von Crotin und Anticrotin, das nicht vollkommen gesättigt ist, kann trotzdem bei unempfindlichen Tieren als gesättigt erscheinen.

Außer des Tierkörpers kann man sich übrigens, besonders im wissenschaftlichen Experiment, auch des Versuchs in vitro als Indikator bedienen. Bei diesen sogenannten „Heilversuchen im Reagenzglas“ (v. Wassermann) messen wir den Wert eines Antitoxins aus seinem Neutralisationsvermögen gegenüber einem bereits an rote Blutkörperchen gebundenen Toxin. Letzteres kann trotz dieser Bindung durch ein wirksames spezifisches Antitoxin den Blutkörperchen auch wieder entzogen werden, allerdings nur bis zu einer gewissen Grenze. Neuerdings ist es Georgi (69a) gelungen, auch durch die Flockungsreaktion nach Sachs und Georgi Antikörper im Diphtherieserum nachzuweisen. Nicolle, Césari und Debains (136a) halten eine Präzipitationsreaktion für brauchbar zur Wertbemessung von Diphtherie- und Tetanusserum.

Nach Festlegung der Testdosis gestaltet sich die Bestimmung des antitoxischen Wertes eines Serums folgendermaßen: Angenommen, es handelt sich um ein Diphtherieserum, von dem man glaubt, daß sein Wert bei 350 oder bei 500 IE. liegt, so kann man 1 ccm desselben mit 349 bzw. 499 ccm physiologischen Kochsalzlösung verdünnen und 1 ccm dieser Verdünnung, gemischt mit der L_0- oder $L_{\dagger}$-Dosis des betreffenden Testgiftes, je einem Meerschweinchen subkutan injizieren. Ist im ersteren Fall (Prüfung auf 350-fach mit L_0) das Tier ohne lokale Erscheinungen (d. h. am 4. Tage „glatt") geblieben, so ist der Wert des Serums mindestens 350 IE. in 1 ccm. Ist in der gewählten Serumdosis weniger als 1 IE. enthalten, d. h. das Serum nicht mindestens 350-fach, so muß eine Induration eintreten. Aehnlich verhält es sich bei der Prüfung mit der $L_{\dagger}$-Dosis, die jetzt in der Prüfungspraxis beim Diphtherieserum stets verwendet wird. Wird ein auszuwertendes Serum mit der $L_{\dagger}$-Dosis gemischt, so sind vier Möglichkeiten vorhanden: 1) Das Tier bleibt glatt, d. h. das Serum ist höherwertig; 2) das Tier stirbt chronisch unter lokalen Krankheitserscheinungen oder kommt gerade noch mit dem Leben davon, d. h. das Serum hat etwas über den supponierten Wert; 3) das Tier stirbt am 4. Tage, d. h. der Wert des Serums ist genau der zu ermittelnde, oder 4) das Tier stirbt früher als am 4. Tage, d. h. das Serum ist geringwertiger, als man angenommen hat.

Neben der Verwendung geeigneter Tiere sind noch eine Reihe wichtiger Faktoren bei der Wertbemessung der Antitoxine zu berücksichtigen, auf die hier nur kurz hingewiesen werden soll. Von größter Bedeutung für alle Prüfungsversuche ist die strenge Innehaltung ein und derselben Technik, da bei der Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin die Zeit, die Temperatur, die Konzentration der Lösungen, der Salzgehalt der Medien und manches andere eine große Rolle spielt. Nach Befunden von Morgenroth (121), Otto und Sachs (144) ist es z. B. sehr wahrscheinlich, daß man bei der Vereinigung von Toxin und Antitoxin auch mit katalytischen Einflüssen in den Subkutangeweben bzw. in dem Serum rechnen muß, worauf bereits v. Behring früher hingewiesen hatte.

Außer der Innehaltung bestimmter Versuchsanordnungen ist schließlich in der Prüfungstechnik noch die Verwendung präziser Meßapparate erforderlich, um kleinste Flüssigkeitsmengen mit absoluter Genauigkeit abmessen zu können.

Speziell für die Zwecke der staatlichen Serumprüfung hat Ehrlich zur Ergänzung der gewöhnlichen Meßpipetten besondere Pipetten eingeführt, die als „Fein"- und „Vollpipetten" von der Firma F. und M. Lautenschläger in Berlin in den Handel gebracht werden. Sie sind „auf Ausfluß" geeicht, d. h. die jeweils durch die bestimmte Markierung angegebene Flüssigkeitsmenge wird durch völliges Aus-

laufenlassen (Ausblasen) der Pipette erhalten. Die „Feinpipetten" sind in $^1/_{100}$ ccm eingeteilt. Meist ist bei ihnen nur ein bestimmter, etwa $1-1^1/_2$ ccm fassender Teil kalibriert, während der untere, nicht kalibrierte Teil ausgebaucht ist (Fig. 4); dadurch ist es möglich, die Länge der Pipetten zu beschränken. Für die Serumprüfung werden als am meisten gebräuchlich Feinpipetten vorrätig gehalten, die eine Kalibrierung von 0,7—2,0 ccm, 1,5—3,0 ccm, 3,0—4,0 ccm, 3,5—4,5 ccm, 4,0—5,0 ccm und 4,5—5,5 ccm tragen.

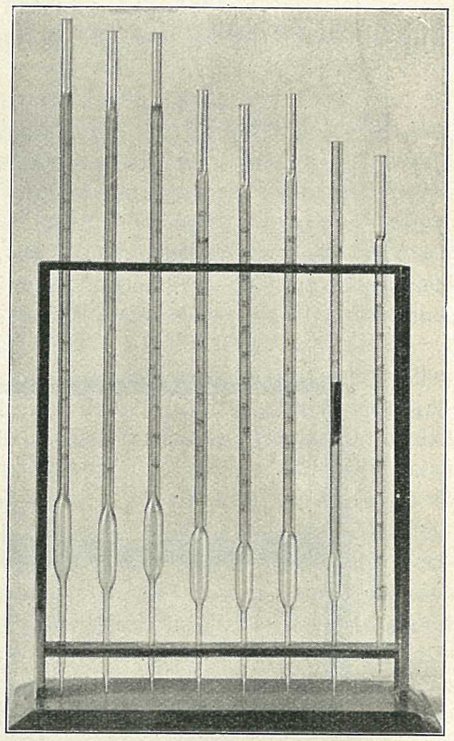

Fig. 4. Ehrlichsche Feinpipetten.

Die Vollpipetten (Fig. 5) dienen zur Abmessung ganz bestimmter, in der prüfungstechnischen Praxis besonders oft benötigter Flüssigkeitsmengen und tragen demgemäß nur einen oder wenige Eichstriche. Auch sie sind zwecks Verminderung ihrer Länge ausgebaucht (Fig. 5 rechts). Außer den auf 1 ccm geeichten Vollpipetten werden am häufigsten solche gebraucht, die Eichungen für 2, 3, 4, 5, 6, 7—10, 17—20, 27—30, 38—40, 48—50, 59, 69, 79 und 99—100 ccm aufweisen.

Die Feinpipetten werden bei der Serumprüfung speziell zur Abmessung der Toxine verwendet.

Für die Abmessung von Serum und Serumverdünnungen bedient man sich besser der kleineren Vollpipetten. Es kommt hier darauf an, daß auf das abzumessende Quantum möglichst wenig Wandfläche entfällt, denn von Serum — besonders dem infolge seines Glyzeringehaltes dickflüssigen Diphtherie-Standardserum — bleiben an den Glaswandungen nach dem Ausblasen immerhin Mengen zurück, die, wenn sie nicht sehr sorgfältig durch mehrfaches Nachspülen mit der Lösungsflüssigkeit aufgenommen werden, die Genauigkeit der Messung beeinträchtigen. Die größeren Vollpipetten dienen zur Abmessung der Verdünnungsflüssigkeiten.

Die Mischungen von Gift + Serum nimmt man entweder nach Rosenau in der Spritze selbst vor, wobei man sich natürlich eine große Zahl gleich-

mäßiger Spritzen vorrätig halten muß, oder aber in kleinen Fläschchen, die wegen der Lichteinwirkung zweckmäßig aus dunklem Glase bestehen. Aus diesen Fläschchen entnimmt man bei kleineren Mengen, z. B. bei der Tetanusprüfung, das zu injizierende Quantum mittels der graduierten Injektionsspritzen, bei größeren Mengen Flüssigkeit, z. B. bei der Diphtherieserumprüfung, gießt man das Gemisch zur Injektion in die geöffnete Kochsche Spritze und spült das Fläschchen sorgfältig mit Kochsalzlösung nach. Eine selbstverständliche Voraussetzung für ein sachgemäßes Arbeiten ist natürlich die absolute Sterilität aller Lösungsmittel, Gefäße und Instrumente.

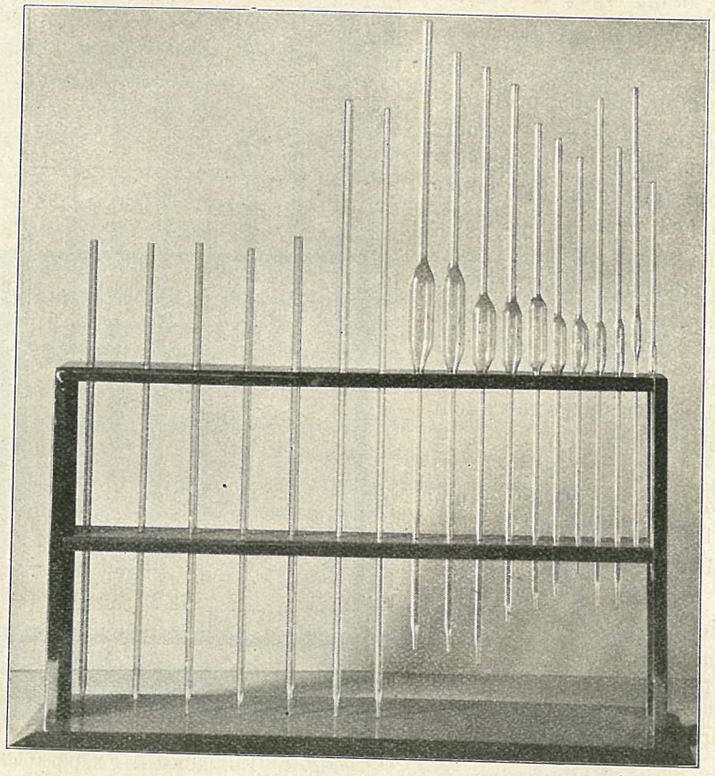

Fig. 5. Vollpipetten.

b) Die Wertbemessung der antibakteriellen Sera.

Wissenschaftlich viel weniger sicher begründet und technisch oft ungleich viel komplizierter als die Bewertung der rein antitoxischen Heilsera ist die der antibakteriellen Sera. Wir kennen leider bis heute bei keinem dieser Immunsera Antikörper, welche als Träger der spezifischen Wirksamkeit eine gleich große und allgemein anerkannte Bedeutung haben wie die Antitoxine im Diphtherie- und Tetanusserum. Zwar konnte man in einzelnen von ihnen neuerdings auch Antitoxine

nachweisen (die Wirkung des Dysenterieserums z. B. scheint in erster Linie eine antitoxische zu sein), aber im allgemeinen kann man bei diesen Serumpräparaten in dem Gehalt an antitoxischen Antikörpern doch nur einen der wirksamen Heilfaktoren sehen. Man muß daher mit R. Pfeiffer die einseitige Bewertung dieser Quote bei den echten „antiinfektiösen" Heilseris als nicht genügend ansehen. Dasselbe gilt aber auch von den übrigen im antibakteriellen Serum vorkommenden Antikörpern. Als solche sind uns bekannt:

1) die Bakteriolysine (R. Pfeiffer, 145, 146).

2) die Bakteriotropine (Neufeld, 129) und die Opsonine (Wright, 188, 189).

3) die Bordetschen Antikörper (33, 34, 35), sowie

4) die mehr negativ charakterisierten Antiaggressine (Bail) und

5) die Antiendotoxine (Macfadyen, 105, 106, Besredka, 23, u. a.).

Ob damit die Summe aller Stoffe, welche in den antibakteriellen Seris, speziell in den „antiinfektiös" (Kolle) wirkenden in Aktion treten, erschöpft ist, muß zweifelhaft erscheinen, solange es noch praktisch wirksame Immunsera gibt, bei denen bekannte Antikörper als Träger der spezifischen Serumwirkung bisher nicht sicher nachweisbar sind, wie z. B. beim Milzbrandserum.

In früherer Zeit war man wohl geneigt, bei den antibakteriellen Seris die Bakteriolysine als die Ursache der spezifischen Serumwirkung anzusehen, nachdem man schon frühzeitig erkannt hatte, daß den Agglutininen und Präzipitinen in dieser Hinsicht keine ausschlaggebende Bedeutung zukommt. Wie R. Pfeiffer (145, 146) und seine Schüler (74, 149) zeigen konnten, gelingt es, die bakterienauflösende Kraft z. B. eines Choleraserums genau quantitativ festzulegen, wenn man fallende Dosen des Serums zusammen mit lebenden Bakterien Meerschweinchen intraperitoneal injiziert (Pfeifferscher Versuch). Bei dieser Bakteriolyse in vivo läßt sich mit Sicherheit diejenige Serumdosis ermitteln, die gerade ausreicht, um das Tier gegen eine bestimmte Prüfungsdosis, z. B. die 10-fach tödliche Dosis einer virulenten Kultur, zu schützen (1 Immunitätseinheit [IE.] nach R. Pfeiffer). Die praktische Erfahrung lehrt aber, daß die Anwendung des Pfeifferschen Versuchs nur bei einigen Seris sich durchführen ließ (Typhus-, Cholera-, Kälberruhrserum) und daß andererseits bei vielen wirksamen antibakteriellen Immunseris Antikörper, ähnlich den Pfeifferschen Bakteriolysinen, nicht nachweisbar waren. Hiermit war bewiesen, daß diese Stoffe nicht die ausschließlichen Träger der antibakteriellen Immunität sein konnten, wie denn auch andererseits bakteriolytisch wirksame Sera in der Therapie versagten.

Neben dem Versuch, die Bakteriolysine in vivo zur Wertbemessung zu benutzen, hat man auch die Bakterienauflösung im Reagenzglase zum quantitativen Nachweis der bakteriolytischen Ambozeptoren

herangezogen (Laubenheimer, Stern und Korte, Hahn). Die hierzu gebrauchten Methoden ergaben, abgesehen davon, daß sie sehr kompliziert waren, sehr ungleichmäßige Resultate. Eine brauchbare Prüfungsmethode ist das „Plattenverfahren“ erst durch die Einführung der von M. Neisser und Wechsberg (124, 125) angegebenen Versuchsanordnung geworden. Ihre Methodik ist folgende:

Zu je $^1/_{5000}$ ccm einer eintägigen Bouillonkultur des betreffenden Bakteriums werden in sterilen Röhrchen fallende Dosen des bei 56° C inaktivierten Immunserums und gleiche Mengen aktiven Meerschweinchenserums als Komplement gegeben. Die Abmessungen müssen derart sein, daß in allen Röhrchen gleiche Mengen Flüssigkeit (z. B. 2,5 ccm) vorhanden sind. Die Verdünnungen und die Auffüllungen erfolgen mit 0,85-proz. Kochsalzlösung. Außerdem werden jedem Röhrchen 3 Tropfen Bouillon zugefügt, um dadurch ein ungestörtes Wachstum in den Kontrollproben zu gewährleisten. Umfangreiche Kontrollen sind stets notwendig, schon um die verwendeten Sera usw. auf Sterilität zu prüfen. Die Proben werden während 3 Stunden bei 37° C gehalten und schließlich zu Agarplatten verarbeitet, indem mit gleichmäßigen Pipetten je 5 Tropfen zur Aussaat verwendet werden. Die Beurteilung der Platten geschieht am zweckmäßigsten nur vergleichs- und schätzungsweise (0, vereinzelte, hunderte, tausende, ∞ Keime).

Zu beachten ist bei derartigen Bakterizidieversuchen in vitro besonders die Verwendung geeigneter Kulturen. Serum- oder komplementfeste Stämme, wie sie z. B. bei Typhus gar nicht so selten vorkommen, sind unbrauchbar. Ferner ist bei Vergleichen die Benutzung ein- und desselben Komplements zu fordern. Auch die Menge der Einsaat spielt insofern eine Rolle, als kleine Dosen große Ausschläge geben. Auf Grund dieser Beobachtung verwandten Neufeld und Lindemann (133) minimale Mengen (bei Typhus $^1/_{40\,000}$ bis $^1/_{100\,000}$ Oese) zur Aussaat und fanden dann Ausschläge bis zu Verdünnungen des Immunserums von $^1/_{1000\,000}$ bis $^1/_{100\,000\,000}$. Sehr häufig beobachtet man gerade bei den bakteriolytischen Reagenzglasversuchen mit kleinen Aussaaten eine auch sonst nicht unbekannte Erscheinung, die darin besteht, daß hinsichtlich der Bakterienvernichtung mit größeren Serumdosen ein schlechterer Erfolg erzielt wird, als mit bestimmten mittleren Dosen. Als Erklärung für dieses Phänomen gilt die sogenannte „Komplementablenkung“ durch die überschüssigen Ambozeptoren (Neisser-Wechsberg). Im allgemeinen ist die Brauchbarkeit des „Plattenverfahrens“ als Wertbemessungsmethode nur eine beschränkte. Einmal tritt die Bakteriolyse in vitro auch nur bei bestimmten Bakterien auf, andererseits fehlt bisher der Nachweis, daß die Sera mit hohem bakteriolytischen Titer in vitro auch in der Praxis hochwirksam sind. Dazu kommt, daß — wie sich gezeigt hat — der in vitro und in vivo gefundene Titer bei einem Serum meist nicht parallel geht (Choleraserum, Neufeld und Hüne, 132, Paratyphus-

serum, Töpfer und Jaffé, 173, u. a.). Dies spricht dafür, daß bei beiden Prozessen vielleicht zum Teil verschiedene Antikörper in Aktion treten, oder daß jedenfalls die bakteriolytischen Vorgänge sich in vitro und in vivo verschieden abspielen (Neufeld).

Ob sich die neuerdings von Fukuhara und Yoshioka (67) für die Wertbemessung des Typhusserums empfohlene Modifikation des alten Pfeifferschen Verfahrens bewähren wird, bleibt abzuwarten.

Das gleiche, was hier bezüglich der Bakteriolysine gesagt ist, gilt im großen und ganzen auch für die übrigen im Reagenzglas bzw. unter bestimmten Versuchsanordnungen im Tierkörper wirksamen Antikörper, von denen zunächst die Bakteriotropine (Opsonine) genannt seien. Auch diese Antikörper können nach unseren bisherigen Kenntnissen bei keinem Immunserum als die ausschließlichen Träger der Heil- und Schutzwirkung angesprochen werden, wenngleich bei bestimmten Seris, z. B. den von Neufeld und seinen Mitarbeitern (134, 135, 136) studierten Pneumokokken-, Streptokokken und Rotlaufseren, die phagozytäre Quote unter den Immunkörpern sichtlich eine Hauptrolle spielt. Bezüglich des Rotlaufserums hat Späth (171) allerdings Einwände gegen die Bedeutung der Bakteriotropine erhoben, indem er darauf hinweist, daß einmal das verhältnismäßig stark bakteriotrope normale Pferdeserum keine nennenswerte Schutzwirkung entfalte und daß andererseits Rotlaufsera nach völliger „Erschöpfung“ unter Verlust der Bakteriotropine nicht erheblich in ihrer Schutzwirkung abgeschwächt seien. Indessen wird man in Ermangelung sonstiger Methoden bei der Wertmessung dieser Sera unter Umständen doch wohl zur Benutzung des Phagozytoseversuches berechtigt sein. Beim Dysenterieserum erscheint dagegen nach den Befunden von Bächer und Laub (7) seine Verwendung nicht statthaft.

Bei der Anstellung des Phagozytoseversuches sind nun eine Reihe von Fehlerquellen zu vermeiden, auf die hier kurz hingewiesen werden soll. Wenn bei ihm auch die Mitwirkung des Komplements nicht erforderlich ist und damit gewisse Versuchskomplikationen wegfallen, so treten hierfür doch besonders durch die Verwendung der Leukozyten eine Reihe neuer Schwierigkeiten auf. Als Vergleichsobjekt hat auch hier ein Standardserum von bestimmtem Gehalt an Bakteriotropinen zu dienen, nachdem die Haltbarkeit der Tropine in diesem als erwiesen anzusehen ist. Bei jedem speziellen Fall ist außerdem vorher die Phagozytierbarkeit der betreffenden Bakterien genau zu ermitteln. Die Kulturen können sich hierin sehr verschieden verhalten und starke Schwankungen des Titers verursachen. Die Reaktion kann speziell durch Spontanphagozytose sehr beeinflußt sein. Geeignete Stämme müssen nach Neufeld und Hüne:

1) innerhalb der Versuchszeit von $1^1/_2$—2 Stunden keine erhebliche Spontanphagozytose zeigen und

2) gut durch spezifisches Serum beeinflußt werden; ferner dürfen 3) sowohl die gefressenen wie auch die außerhalb der Zellen liegenden Kokken innerhalb der angegebenen Zeit keine stärkere Degeneration erleiden. Die gleichzeitige Erfüllung dieser Anforderungen bereitet oft Schwierigkeiten.

Auf die Versuchstechnik soll später (S. 96) bei der Besprechung der Wertbemessung des Meningokokkenserums näher eingegangen werden. Gleichmäßige Resultate, wie sie für Vergleichsprüfungen notwendig sind, lassen sich bei Phagozytoseversuchen nur in der Hand von Untersuchern erzielen, die die Technik völlig beherrschen und alle Fehlerquellen genau kennen. Auch bei Erfüllung dieser Voraussetzungen ist der bakteriotrope Reagenzglasversuch als Prüfungsverfahren an sich wenig empfehlenswert, weil die Beurteilung des Ergebnisses auch bei gleichmäßigster Technik dem subjektiven Ermessen des Untersuchenden einen so weiten Spielraum läßt, wie es für eine amtlich eingeführte Prüfungsmethode nicht wünschenswert ist. Keinesfalls dürfen die Ergebnisse des Phagozytoseversuches allein als maßgebend für die Wertigkeit eines Serums angesehen werden (vgl. S. 99).

Außer dem Neufeldschen Verfahren könnte man auch die Leishman-Wrightsche Methodik (Näheres siehe bei Neufeld, 129) zur Wertbemessung der Heilsera heranziehen. Im allgemeinen gilt für die Opsonine dasselbe, was für die Bakteriotropine gesagt ist.

Weiterhin ist die Bestimmung der Bordetschen Antikörper, deren Technik auf S. 94 geschildert ist, zur Wertbemessung der Sera herangezogen worden.

Auch für diese Antikörper gilt das oben allgemein Gesagte. Da es sich bei ihnen außerdem um Antieiweißkörper handelt, dürfte ihre Bedeutung als Träger der Schutzwirkung ähnlich beurteilt werden können, wie die der Agglutinine und Präziptine. Nachgewiesen ist übrigens durch zahlreiche Versuche (Nedrigailoff: Rotlauf- und Streptokokkenserum; Moreschi, Neufeld und Hüne: Typhusserum; Haendel: Choleraserum; Kolle und Hetsch, Jatta und Maggiora, Vay, Damperoff: Pestserum; Spaeth: Rotlaufserum; Onaka: Meningokokkenserum usw.), daß sie weder mit den Bakteriolysinen noch mit den die Schutzwirkung sonst ausübenden Schutzkörpern (Bakteriotropinen und anderen antiinfektiös wirkenden Körpern) identisch sein können. Bei „Erschöpfungsversuchen" hat sich gezeigt, daß völlig erschöpfte Sera im Tierversuch noch wirksam waren. Man kann daher im allgemeinen den Gehalt an „komplementbindenden" Stoffen höchstens in Ergänzung anderer Methoden zur Wertbemessung benutzen. Im allgemeinen steigen bei längerer Dauer der Immunisierung zugleich mit den Bordetschen Antikörpern auch die anderen Schutzstoffe im Serum an, es braucht dies aber durchaus nicht immer der Fall zu sein.

Wir sehen demnach, daß weder den Bakteriolysinen noch den Bakteriotropinen (Opsoninen) und Bordetschen Antikörpern bei der Wertbemessung der Heilsera bisher eine ausschlaggebende Bedeutung zugesprochen werden kann.

Noch weniger ist dies für die Antiaggressine der Fall. Auf die Möglichkeit, ihren Nachweis als Wertbemessungsmethode zu benutzen, soll hier nicht näher eingegangen werden, zumal es immer noch zweifelhaft erscheinen muß, ob es sich überhaupt bei den von Bail (8) angenommenen „Aggressinen" um neue, bis dahin unbekannte Antigene mit besonderer Aktion handelt.

Was die „Anti-Endotoxine" betrifft, so hat schon R. Pfeiffer bei seinen ersten Immunisierungsversuchen nachgewiesen, daß mit Choleravibrionen aktiv immunisierte Tiere schließlich enorme Mengen Vibrionenendotoxine vertragen. Speziell sprechen aber die Versuche von Macfadyen, Besredka, Kraus u. a. dafür, daß mit Endotoxinen gewonnene Sera spezifisch anti-endotoxische Eigenschaften besitzen. R. Pfeiffer und Bessau (147, 148) haben den Mechanismus der Endotoxin-Entgiftung genauer studiert und nachgewiesen, daß es sich hierbei nicht um eine Neutralisation durch ein Antitoxin handelt, bei dem das „Gesetz der konstanten Proportionen" gilt, sondern daß bei der Entgiftung ein fermentativer Abbau des Endotoxins zu atoxischen Substanzen erfolgt. An diesem Abbauprozeß, der wahrscheinlich ein sehr komplizierter Vorgang ist, beteiligt sich nicht nur der spezifische Antikörper, sondern auch eine Komponente des vergifteten Organismus, die wahrscheinlich mit dem Komplement identisch ist. Das erste Stadium des Abbaus ist nach R. Pfeiffer und Bessau die mikroskopisch nachweisbare Bakteriolyse; Bakteriolyse und Endotoxinentgiftung sind Wirkungen desselben Agens. Nach diesen Autoren kann z. B. bei der Serumbehandlung des Typhus von einer echten antitoxischen Therapie nicht die Rede sein, vielmehr erstreben sie als Ziel die Gewinnung möglichst wirksamer bakteriolytischer Sera.

Ob es möglich sein wird, die Wertbemessung antiendotoxisch wirkender Sera, z. B. des Typhusserums, allein mit Hilfe ihrer antiendotoxischen Wirkung durchzuführen, muß vorläufig noch dahingestellt bleiben.

Wenn wir also zu dem Schlusse gelangen, daß uns bisher bei den „antibakteriellen" (antiinfektiösen [Kolle]) Seris keine Antikörper bekannt sind, deren alleinige „Bestimmung" — ähnlich wie die der Antitoxine bei antitoxischem Serum — genügt, um ihren Wirkungswert zu bemessen, so müssen wir noch kurz die Ansicht von Ungermann und Kandiba (176) erwähnen, nach der die mit zahlreichen antiinfektiösen Seris beobachteten Mißerfolge nicht auf der Art der Antikörper, sondern auf bisher nicht überwundenen, durch die qualitativen und Verteilungsverhältnisse gegebenen Schwierigkeiten beruht. Sollte es

gelingen, durch deren Beseitigung bessere serumtherapeutische Erfolge zu erzielen, so wird damit auch der Prüfungstechnik der Weg gewiesen sein.

Aus den Erfahrungen der Praxis wissen wir, daß es doch eine Reihe von antiinfektiösen Seris gibt, die sich trotz ihres schwankendem Gehaltes an dem einen oder anderen Immunkörper praktisch bewähren und sich im Tierversuch genau quantitativ bewerten lassen, und zwar dann, wenn man auf die Messung bestimmter Antikörper verzichtet und der Wertbemessung die Schutzimpfung mit Serum gegen eine gleichzeitige oder nachfolgende Allgemeininfektion mit lebenden Infektionserregern zugrunde legt. Es ist zur Erklärung dieser Tatsache wohl anzunehmen, daß bei der (nicht lokal beschränkten) Serumwirkung im Tierkörper außer den oben angeführten Antikörpern noch eine Reihe anderer, bisher nicht nachweisbarer oder uns unbekannter Stoffe beteiligt sind. Inwieweit diese mit Antifermenten, Antiendotoxinen, Antiaggressinen oder anderen Körpern des Serums identisch sind, soll hier nicht näher geprüft werden.

Man kann annehmen, daß bei einem wirksamen Serum im Tierversuch annähernd die gleichen Faktoren in ihrer Gesamtheit in Aktion treten, die auch bei Spontaninfektionen bei Mensch und Tier wirksam sind. Besonders berechtigt muß eine derartige Annahme erscheinen, wenn die Verhältnisse des Prüfungsversuchs eine Versuchsanordnung hinsichtlich Infektion und Serumapplikation gestatten, die den natürlichen Verhältnissen entspricht. So werden z. B. bei der Wertbemessung des Pestserums an der Ratte sich fast die gleichen Bedingungen experimentell herstellen lassen, wie in der Wirklichkeit bei Spontaninfektionen. Aber auch dann wird der Tierversuch und schließlich auch jede andere quantitativ genau arbeitende Methode mit der Zeit brauchbare Resultate nur erwarten lassen, wenn es sich um ein in der Praxis wirksames Immunserum handelt, wie denn überhaupt der Wert eines Serums nur nach den praktischen Erfolgen beurteilt werden kann. Ist in diesem Falle irgendeine Wertbemessungsmethode gefunden, wobei wir in erster Linie stets an den Tierversuch denken, so wird sich im Laufe der Zeit herausstellen, ob der im Prüfungsversuch ermittelte Gehalt an spezifischen Immunkörpern mit dem praktischen Heilwert des Serums parallel geht. Ebenso wird man Sera, deren theoretisch angenommene Wirksamkeit bis dahin noch nicht mit Sicherheit erwiesen ist oder doch erst in der Praxis erprobt werden soll, zu einer Wertbemessung („provisorisch") zulassen, sobald eine Prüfungsmethode vorliegt, die wenigstens im Laboratorium ihren Gehalt an Schutzkörpern, am besten im Tierversuch, fest bestimmen läßt.

Wir müssen nun noch auf einige Schwierigkeiten hinweisen, die sich theoretisch und praktisch der Wertbemessung im Tierversuch entgegenstellen können. Ein großer Nachteil des letzteren beruht z. B. schon darin, daß nur eine beschränkte Anzahl der menschlichen Infektionskrankheiten auf Tiere übertragbar ist. Wir kommen dabei zu einer ähnlichen Bedingung, wie sie bei der Wertbemessung eines antitoxischen Serums erfüllt sein mußte, nämlich zur Forderung einer Tierart, welche für die bei den Prüfungsversuchen anzuwendenden Bakterien eine genügend gleichmäßige Empfänglichlichkeit bzw. Resistenz zeigt. Hier besitzen wir in der Maus ein Tier, das für diese Zwecke in vielen Fällen sehr geeignet ist.

Für die Prüfungstechnik ergibt sich dabei die theoretisch wichtige Frage, inwieweit das im Prüfungsversuch zur Verwendung gelangende Tiermaterial fähig ist, das in der Regel an großen Tieren (Pferden, Mauleseln usw.) gewonnene Serum genügend gleichmäßig zu komplettieren.

Da wir, ohne auf die verschiedenen Möglichkeiten der Antikörperwirkung näher einzugehen, mit Ehrlich annehmen, daß bei der Schutzwirkung im Tierkörper die in erster Linie wirksamen Antikörper Ambozeptortypus haben, wird der Erfolg der Schutzwirkung im Tierkörper von dem mehr oder weniger guten Zusammenwirken beider Komponenten, des Ambozeptors und des Komplementes, abhängen. Nun wissen wir, daß hier Störungen von beiden Seiten vorkommen können. Bezüglich des Komplementes fand Wechsberg z. B., daß der durch die Immunisierung von Tauben mit Vibrio Metschnikoff gewonnene Ambozeptor zwar mit Taubenserum komplettiert wird, dagegen nicht der durch Immunisierung von Kaninchen erhaltene. Eine ähnliche Beobachtung machten Kolle und Otto (82, 83). Ein bei Ratten und Mäusen hochwirksames, vom Pferde gewonnenes Pestserum versagte beim Meerschweinchen, dagegen war bei dieser Tierart das Serum immuner Meerschweinchen wirksam, trotzdem es bei Ratten und Mäusen keine nennenswerten schützenden Eigenschaften entfaltete.

Andererseits werden sich auch gewisse Störungen im Tierversuch von dem Immunkörper (Ambozeptor) herleiten lassen. Wir kennen einmal noch zu wenig die quantitativen Beziehungen zwischen den Schutzstoffen und den Infektionserregern im Tierkörper. Wie an anderer Stelle (S. 105) näher ausgeführt ist, spielt es unter Umständen auch eine Rolle, ob ein Serum „polyvalent" wirksam sein muß. Eine solche Polyvalenz wird erforderlich, wenn bei einer Infektionskrankheit — wie dies nach Jensen und Joest bei der Kälberruhr und nach Ostertag und Wassermann bei der Schweineseuche der Fall ist — die Bakterienstämme in ihrem Rezeptorenapparat zwar bestimmte dominante Rezeptoren besitzen, die einzelnen Stämme aber Partialambozeptoren aufweisen, die stark voneinander abweichen. In diesem Falle wird es notwendig, sogenannte „multipartiale" Sera durch Vorbehandlung

der Tiere mit möglichst vielen, untereinander differenten Stämmen derselben Bakterienart zu gewinnen. Ein solches „multipartiales“ Serum setzt sich, entsprechend den individuell verschiedenen Nebenrezeptoren, aus einer weit größeren Anzahl verschiedener Partialteile zusammen, als ein nur mit einem Stamm gewonnenes „monovalentes“ Serum, das seinerseits durch den hohen Gesamtgehalt an Ambozeptoren ausgezeichnet sein kann, aber infolge der geringen Zahl verschiedener Partialambozeptoren sehr wenig breit wirkt. Ein solches monovalentes Serum wird nach den Anschauungen von Wassermann und Ostertag (186), wenn es zufällig einen homologen Stamm trifft, bereits in kleineren Dosen wirken, als ein multipartiales. Dieses letztere wird den einzelnen Stamm erst in höheren Konzentrationen beeinflussen, dafür aber in den verschiedensten Fällen seine schützende Wirkung entfalten. Bei der Prüfung solcher „multipartialen“ Sera muß das Wertbemessungsverfahren diesem Umstande durch Auswertung gegen die Infektion mit verschiedenen Bakterienstämmen Rechnung tragen (vgl. S. 106).

Eine andere praktische Schwierigkeit bei der Prüfung der antibakteriellen Sera im Tierversuch bedeutet die Verwendung lebender Kulturen. Abgesehen von der Art der Infektion und der Serumapplikation ist die richtige Wahl der Infektionsdosis vielfach von größter Bedeutung. Es hat sich gezeigt, daß das Gesetz der Multipla hier keine Gültigkeit hat. Eine bestimmte Serumdosis kann gegen die millionenfach tödliche Dosis schützen, während selbst größere Bruchteile der Serumdosis bereits bei der 10-fach tödlichen Dosis versagen. Es bestehen, wie dies Neufeld und Haendel (131) sowie Ungermann und Kandiba (176) gezeigt haben, häufig sehr enge Relationen („Schwellenwerte“) zwischen schützender Serummenge und Körpergewicht, die genau berücksichtigt werden müssen.

Störend wirkt ferner beim Prüfungsversuch gegen die Infektion mit lebenden Erregern oft die schwankende Virulenz der Kulturen. Selbst wenn man sorgfältig bemüht ist, durch regelmäßige Ueberimpfung und durch Tierpassagen eine möglichst gleichmäßige Virulenz der Bakterienstämme zu erzielen, wird man doch immer wieder auf große Schwankungen stoßen. Bei den amtlichen Prüfungen im Frankfurter Institut hat sich dabei die sehr wichtige Tatsache ergeben, daß eine Prüfungskultur, ohne an ihrer pathogenen Wirkung zu verlieren, in ihrer Resistenz gegenüber dem Schutzserum nachlassen kann. Während z. B. die Kontrolltiere nach wie vor prompt durch $^1/_{100}$ ccm der Bazillentestkultur getötet wurden, schützt mitunter unerwartet nicht nur 0,01 ccm Serum gegen diese Infektionsdosis, sondern schon 0,001 ccm, eine Menge, die ursprünglich wirkungslos war. Die Resistenz der Kultur gegen das Immunserum hat sich also geändert, und diese Aenderung der Resistenz erwies sich als ein viel feineres

Reagens auf die beginnende Virulenzabschwächung der Prüfungskultur, als der Termin des Todeseintritts nach einer bestimmten Infektion. Die aus dieser Tatsache entstehenden Schwierigkeiten lassen sich aber leicht umgehen, wenn die Serumprüfung im Vergleich mit einem Standardserum vorgenommen wird (P. Ehrlich). Es müssen dazu zwei Versuchsreihen angestellt werden. Die erste, mit dem Standardserum angesetzte Reihe gibt an, welche Serumdosis gegen die vorliegende Infektion noch schützt; die zweite, mit dem zu prüfenden Serum angesetzte Reihe gestattet im Vergleich mit der ersten einen genauen Rückschluß auf den Wert des betreffenden Serums.

Trotz der oft nicht unerheblichen Schwierigkeiten ist es bei Verfolgung der eben skizzierten Richtlinien gelungen, für eine Reihe antibakterieller Sera zuverlässige Wertbemessungsmethoden auszuarbeiten. In der Hauptsache handelt es sich dabei um Infektionskrankheiten, deren Erreger beim Prüfungstier eine Allgemeininfektion (ohne starke Toxinwirkung) hervorrufen.

Wie bereits erwähnt, bemessen wir den Wertgehalt der antibakteriellen Sera (mit Ausnahme des Meningokokkenserums) stets durch Prüfung ihres „Schutzwertes“ im Tierversuch, da bei fast allen eine eigentliche kurative Wirkung sich experimentell vielleicht noch schwerer nachweisen läßt als bei den Antitoxinen. Während hier v. Behring und seine Schüler (vgl. Knorr, 79) und Dönitz (45, 47) nachweisen konnten, daß man wenigstens noch nach einiger Zeit durch hohe Serumdosen einen als Heilwirkung aufzufassenden Einfluß ausüben kann, geht aus den Beobachtungen von Lazarus (99), Issaeff (74), sowie von Sobernheim und Jacobitz (170) hervor, daß die zeitliche Heilungsgrenze z. B. beim Choleraserum im Pfeifferschen Versuch eine außerordentlich beschränkte ist. Mit Immunserum allein ließ sich nur ganze kurze Zeit nach der Infektion noch Heilung erzielen, auch mit Hilfe einer kombinierten Ambozeptor-Komplementbehandlung nur noch $2^1/_2$ Stunden nach der Infektion, während nach 5 Stunden alle Bemühungen vergeblich waren. Aehnliche, wenig günstige Resultate erhielten auch andere Autoren sonst mit bakteriziden Seris, u. a. Kolle und seine Mitarbeiter (82, 83, 22) bei Heilversuchen mit Pestserum. Bei diesen schien es sogar häufig, als ob die späte Serumanwendung eher schädlich wirkte als nützlich, eine Erscheinung, die auch bei anderen Seris beobachtet wurde (siehe z. B. Kutscher und Meinicke, 98, und Wolff, 187) und in der Weise erklärt wird, daß die bakteriziden Kräfte der Sera zwar noch imstande sind, die bereits reichlich im Körper zur Vermehrung gelangten Bakterien abzutöten, daß dann aber das Individuum den nunmehr frei gewordenen Endotoxinen — welche bekanntlich den eigentlichen Toxinen fernstehen und sich von ihnen vor allem dadurch unterscheiden, daß gegen sie eine Antikörperbildung sehr schwer zu erzielen ist — erliegt.

Wie bei den antitoxischen Seris, so pflegen wir auch bei den bakteriziden Heilseris den gefundenen Wirkungswert nach Immunitätseinheiten auszudrücken, und zwar ist zunächst bei allen der staatlichen Kontrolle bisher unterstellten, im Tierversuch zu prüfenden Seris als Normalserum ein solches betrachtet worden, von dem 0,01 ccm gegen die nachfolgende (mehrfach) tödliche Dosis schützt (1 ccm dieses Serums = 1 IE.). Im Laufe der Zeit hat sich aber der Brauch eingebürgert (mit Ausnahme bei der Wertbemessung des Aronsonschen Antistreptokokkenserums), ein Serum, das in der Dosis von 0,01 ccm gegen die nachfolgende (mehrfach) tödliche Dosis lebender Bakterien schützt, kurz als „hundertfach" zu bezeichnen.

Auch die den Prüfungen der verschiedenen antibakteriellen Sera zugrunde gelegte „Immunitätseinheit" ist ein zunächst willkürlich gewähltes Maß, das nun aber ein für allemal feststeht. Als Träger dieses Maßstabes dienen uns auch bei allen der staatlichen Prüfung unterstellten antibakteriellen Seris Standardsera von bestimmtem Gehalt an Immunitätseinheiten.

Auch Heilsera gegen Infektionskrankheiten mit noch unbekannten Erregern können einer Wertbemessung unterzogen werden. Am meisten empfehlenswert ist auch hier der Tierversuch, wenngleich die einigermaßen zuverlässige Bestimmung der Menge und Virulenz des Virus oft auf große Hindernisse stößt. Man mischt z. B. infektiöses Material vom kranken Tier (Lymphe, Blut) mit fallenden Dosen Serum, injiziert das Gemisch geeigneten Prüfungstieren und ermittelt so diejenige Serummenge, welche die tödliche Infektion verhindert. Man hat auch Reagenzglasmethoden heranzuziehen versucht; aber abgesehen davon, daß sie bei einigen Seris völlig versagen (z. B. die Komplementbindung beim Lyssaserum, Poliomyelitisserum usw.), müssen auch hier grundsätzlich die gleichen Bedenken gegen alle vom Tierversuch absehenden Prüfungsmethoden erhoben werden, wie bei den antibakteriellen Seris.

Von den Seris gegen Seuchen mit unbekannten Erregern, die teilweise in der Praxis große Bedeutung haben, seien genannt: das Rinderpestserum (Kolle und Turner), das Serum gegen Maul- und Klauenseuche (Löffler), das Schafpockenserum (Borrel), das rabizide Serum (Babes, Tizzoni, Kraus) und das Schweinepestserum (Dorset, Uhlenhuth).

Spezieller Teil.

1. Die Prüfung des Diphtherieserums.

Von Pferden gewonnene Diphtheriesera müssen bestimmungsgemäß mindestens einen Antitoxingehalt von 350 IE. im Kubikzentimeter aufweisen. Von Hammeln oder Rindern gewonnene Sera, die speziell für Schutzimpfungszwecke hergestellt werden (vgl. S. 35), erreichen erfahrungsgemäß höchstens einen Titer von 250 IE. im Kubikzentimeter.

Die Wertbestimmung des Diphtherieserums erfolgt in der Weise, daß nach der von Ehrlich (53) eingeführten Prüfungsmethode der Antitoxingehalt des Serums festgestellt wird.

Ursprünglich ging man in der Weise vor, daß man die Versuchstiere mit der sicher tödlichen Dosis einer virulenten Kultur infizierte und ihnen dann fallende Mengen Heilserum injizierte, um derart die Dosis zu ermitteln, welche genügte, um das Tier vor dem Tode zu schützen. Da jedoch die Infektion mit lebender virulenter Kultur, wie sich bald herausstellte, sehr schwankende Resultate gab, mußte man diese Methode, den „Heilwert" des Serums zu bestimmen, verlassen. Auch die Prüfung des „Immunisierungswertes" gegen die nachfolgende Infektion erwies sich nicht als sicherer. Einen großen Fortschritt bedeutete das von v. Behring und Boer (13, 14) im Jahre 1893 angegebene Verfahren, die Infektion durch die Intoxikation zu ersetzen, wie dies Ehrlich bereits bei seinen Untersuchungen über die Ricinimmunität getan hatte.

Die Grundlage für die jetzige Prüfungstechnik des Diphtherieserums wurde gelegt durch die von Ehrlich, Kossel und Wassermann (59) ausgearbeitete Gift-Serum-Mischungsmethode in vitro. Der Vorzug dieser Methode, bei der mit der 10-fach tödlichen Giftdosis gearbeitet wurde, in der Vorstellung, daß das Toxin und das Antitoxin eine chemische Verbindung eingehen, gegenüber der früheren bestand darin, daß Gift und Serum im Gemisch injiziert wurden, wodurch eine stets gleichmäßige Einwirkung beider Körper aufeinander innerhalb des Tierkörpers gewährleistet wurde. Zur 10-fachen Dosis letalis wurden deshalb im Reagenzglas fallende Dosen des zu prüfenden Serums zugesetzt. Sämtliche Gemische wurden dann durch Zusatz von Kochsalzlösung auf 4 ccm aufgefüllt und Meerschweinchen von 250 g subkutan injiziert. Wenn nun z. B. die Testgiftdosis durch $^1/_{10}$ ccm Serum neutralisiert wurde, so enthielt das Serum in 1 ccm genau 1 IE.: man hatte ein „einfaches" Serum. Genügte zur Neutralisierung bereits 0,001 ccm, so war das Serum 100-fach, d. h. es enthielt in 1 ccm 100 IE. Die Neutralisation wurde als genügend angesehen, wenn das Gift-Serum-Gemisch nur eine unbedeutende Reaktion hervorrief, die bis zum 4. Tage rückgängig geworden war (L_0-Wert).

Dieses Verfahren erwies sich aber als nicht genügend zuverlässig, denn es zeigte sich, daß Sera, die mit verschiedenen Giften in verschiedenen Instituten geprüft wurden, ganz ungleiche Werte ergaben. Es gelang Ehrlich, auf Grund zahlreicher Untersuchungen, deren Ergebnisse er in

seinen Abhandlungen „Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums“ (53) und „Ueber die Konstitution des Diphtheriegiftes“ (54) niedergelegt hat, das Prüfungsverfahren so zu verbessern, daß derartige Störungen ausgeschlossen sind.

Der fundamentale Fortschritt der EHRLICHschen Methode der Wertbemessung lag darin, daß EHRLICH das Gift als Träger der Maßeinheit verließ und statt dessen das Antitoxin hierfür wählte. Zu dieser Aenderung wurde er durch die wichtige Entdeckung veranlaßt, daß die beiden analysierbaren Funktionen der Gifte, ihre Giftwirkung und ihre Fähigkeit, Antitoxine zu binden, durchaus nicht zahlenmäßig parallel gehen. Als Grund hierfür erkannte er die komplexe Konstitution des Diphtheriegiftes, das man bis dahin allgemein für einen einheitlichen Körper gehalten hatte, in dem man aber nach den Untersuchungen EHRLICHS neben zwei verschiedenen primären Giften, dem Toxin und dem Toxon, eine Anzahl sekundärer Gifte mit verschiedener Avidität zum Antitoxin annehmen muß. Da die sekundären molekularen Umlagerungen, bei denen die ungiftigen, aber antitoxinbindenden Toxoide entstehen, vom Augenblick der Giftbildung an vor sich gehen und erst ziemlich spät — etwa nach einem Jahre — aufhören, war es erklärlich, daß man einerseits bei der Wertbemessung mit einem und demselben Gifte zu verschiedenen Zeiten, andererseits mit verschiedenen Giften zu der gleichen Zeit ungleiche Resultate erhalten mußte.

Eine weitere Verbesserung der neuen Prüfungsmethode bestand darin, daß EHRLICH statt der bis dahin üblichen L_0-Dosis die L_{+}-Dosis als Prüfungsdosis einführte. Bei der Bestimmung des L_0-Wertes (vgl. Tabelle 7) ist mitunter das Urteil, ob noch eine geringgradige Reaktion vorhanden ist oder nicht, schwierig. Differenzen in der Beurteilung können z. B. darin ihren Grund haben, daß die lokale Reaktion verschieden ist, je nachdem man rein subkutan oder submuskulär injiziert; in letzterem Falle ist sie deutlich geringer. Während hier also Meinungsverschiedenheiten entstehen können, wurde durch die Einführung der L_{+}-Dosis als Prüfungsdosis an Stelle des unsicheren, mehr dem subjektiven Ermessen überlassenen Befundes ein objektiver Befund gesetzt. Der Tod bzw. das Ueberleben des Tieres zeigte, wenn man sich so ausdrücken will, rein automatisch den Wertgehalt des Serums an. Auch trug der Umstand zur Verbesserung der Schärfe der EHRLICHschen Methode bei, daß man nicht mehr den neutralisierenden Wert einer $^1/_{10}$, sondern einer vollen IE. ermittelte. Durch diese Verbesserungen wurde es erreicht, daß die neue Prüfungsmethode mit einer Fehlerquelle von höchstens 2 Proz. arbeitet. Diese fast absolute Genauigkeit wurde am schlagendsten bewiesen durch Wertbemessungen, welche gleichzeitig an den verschiedensten Orten (London, Kopenhagen, Steglitz usw.) vorgenommen wurden. Ihr allein ist es zu

verdanken, daß auch das Ausland fast allgemein sich den EHRLICHschen Maßstab zu eigen gemacht hat, wodurch für die Einheit der Wertbemessung des Diphtherieserums und damit für die Beurteilung der Serumtherapie außerordentlich viel gewonnen wurde.

Wie wenig namentlich früher die ausländischen Sera den angegebenen Werten entsprachen, möge Tabelle 4 zeigen, in welcher der „angegebene“ und „tatsächliche“ Wert von 35 im hiesigen Institut untersuchten ausländischen Seris gegenübergestellt ist. Aus ihr (z. B. Nr. 2 und Nr. 34) geht hervor, daß mehrfach völlig wertlose Präparate in den Handel gebracht wurden.

Tabelle 4.

Lfd. Nr.	Bezeichnung des Serums	Ausgegeben am?	Angegebener Wert		Im Frankfurter Institut gefundener Wert	
			? IE. in ? ccm	? IE. in 1 ccm Serum	Datum der Prüfung	? IE. in 1 ccm Serum
1	Russ. S. O.	27. VIII. 97	1500/10,0	150	8. II. 98	ungef. 75
2	Span. S. B.	?	?	?	25. IV. 98	= 0
3	Am. S. M. C. S. 1	20. VI. 98	500/5,0	100	3. IX. 98	>250 <275
4	Am. S. P. D. 4	14. VII. 98	2000/7,5	266	3. IX. 98	>280 <300
5	Am. S. H. D. 8	21. V. 98	2500/4,5	555	3. IX. 98	ungef. 660
6	Am. S. H. D. 4	23. VI. 98	1500/6,5	ca. 230	3. IX. 98	>210 <220
7	Am. S. G. D. A.	?	3000/20,5	ca. 150	5. IX. 98	>75 <100
8	Am. S. H. D. 6a	28. III. 98	3000/11,0	273	9. IX. 98	ungef. 375
9	Am. S. P. D. 5	?	3000/7,0	430	9. IX. 98	ungef. 500
10	Russ. S. C. M. G.	19. X. 98	1000/3,0	333	21. XI. 98	ungef. 350
11	E. D. St. S. (Trockenserum)	?	—	3200	27. I. 99	ungef. 2660
12	Belg. S. 89	1. II. 99	1500/7,5	200	4. VIII. 99	200
13	Belg. S. 91	3. X. 96	2000/10,0	200	4. VIII. 99	>125 <150
14	F. P. S. 87	1. VI. 98	1500/10,0	150	4. VIII. 99	>75 <100
15	F. P. S. 83	15. III. 96	2000/10,0	200	4. VIII. 99	>30 <40
16	Belg. S. 88.	27. XI. 97	1200/10,0	120	5. VIII. 99	ungef. 75

Lfd. Nr.	Bezeichnung des Serums	Ausgegeben am?	Angegebener Wert: ? IE. in ? ccm	Angegebener Wert: ? IE. in 1 ccm Serum	Im Frankfurter Institut gefundener Wert: Datum der Prüfung	Im Frankfurter Institut gefundener Wert: ? IE. in 1 ccm Serum
17	Oe. B. Kr.	27. III. 99	1000/5,0	200	21. VI. 99	ungef. 100
18	S. S. A.	16. I. 00	1000/5,0	200	26. V. 00	ungef. 200
19	R. R. S.	12. IV. 00	—	600	3. X. 00	>350 <400
20	R. K. 104	?	—	600	4. I. 01	600
21	Belg. S. 26	27. VIII. 00	1750/10,0	175	2. X. 01	>135 <144
22	Belg. S. 58	26. X. 00	1500/11,0	136	2. X. 01	>60 <66
23	Belg. S. 8040	10. VIII. 01	1500/8,0	187,5	2. X. 01	>138 <150
24	F. P. S.	?	?	175 (?)	2. X. 01	>162 <168
25	R. G.	31. III. 02	—	500	21. IV. 02	ungef. 500
26	R. D. O.	21. X. 02	—	400	12. X. 02	ungef. 600
27	J. S. B. a)	?	—	150	2. II. 03.	ungef. 150
28	J. S. B. b)	?	—	250	2. II. 03	>250
29	E. S. B.	?	2000/4,0	500	7. III. 03	>300 <400
30	F. St. S.	? XI. 02	—	18	6. III. 03	24
31	Jap. S. S. 25	?	—	500 (550 ?)	25. III. 03	>500 <550
32	E. D. A. W. 1	?	2000/3,0	333	2. VII. 04	nicht voll 250
33	E. D. A. W. 2	?	2000/3,0	666	2. VII. 04	knapp 650
34	Bras. A. dift. M.	9. VII. 04	1500/3,0	500	24. X. 04	>10 <20
35	Am. St. Ser.	14. XII. 05	—	11,5	3. II. 06	11,5

In Amerika wird bei der von Rosenau (156) näher geschilderten Wertbemessung des Diphtherieserums ebenfalls nach den Ehrlichschen Grundsätzen verfahren.

Das in Paris im Institut Pasteur herstellte Diphtherieserum ist kein eigentliches Blutserum, sondern Zitronensäureplasma, dem konservierende Mittel nicht zugesetzt werden. Es wird nur in einer Stärke, nämlich als 200- bzw. 250-faches Serum und stets in einer Füllung, nämlich zu 2000 bzw. 2500 IE., also zu 10 ccm abgegeben. Bei diesem Serum wird außer der Antitoxinbestimmung, die ebenfalls nach dem Ehrlichschen Prinzip erfolgt (Levaditi, 100; Kleinschmidt, 77) auch der Titer gegen die Infektion mit lebenden Diphtheriebazillen ermittelt.

Nach der von Roux und seinen Mitarbeitern (159, 160) ausgearbeiteten Methode wird 1) die Schutzkraft (pouvoir préventif) und 2) die Heikraft (pouvoir curatif) geprüft. Man bezeichnet die Schutzkraft eines Serums mit 50 000, wenn $^1/_{100}$ ccm Serum ein Meerschweinchen von 500 g gegen die ein Kontrolltier von dem gleichen Gewicht in 30—40 Stunden tötende Dosis Gift schützt. Die Beziehung zwischen dem Gewicht des Tieres und der

Menge des angewandten Serums bemißt also seine Schutzkraft. Das Serum wird den Tieren (Meerschweinchen) 12 Stunden vor dem Gifte injiziert, und das Tier darf nach 4—6 Tagen keinen Gewichtsverlust erlitten haben. Andererseits bewertet man die Heilkraft des Serums, indem man einem Tiere die Bakteriendosis, welche die Kontrolltiere in 36—40 Stunden tötet, und 6 Stunden später eine bestimmte Serummenge injiziert. Die Meerschweinchen, welche am 6. Tage leben, werden als geheilt betrachtet. Ein Serum würde z. B. 1000-fach sein, wenn 0,05 ccm ein Meerschweinchen von 500 g unter diesen Bedingungen zu retten vermögen.

Madsen (107) hat sich der Aufgabe unterzogen und vergleichende Prüfungen mit der Ehrlichschen und französischen Methode angestellt.

Tabelle 5.

Serum	Verhältnis zum Gewicht des Tieres	Ausfall der Probe	Infiltration
Nr. 1	1: 50 000	das Meerschweinchen lebt	kleine Infiltration
	1: 50 000	desgl.	„ „
	1:100 000	desgl.	große „
	1:100 000	desgl.	„ „
	1:200 000	† 3 Tage nach der Einspritzung	—
	1:200 000	† 3½ „ „ „ „	—
Nr. 2	1:100 000	das Meerschweinchen lebt	große Infiltration
	1:100 000	desgl.	„ „
	1:100 000	† 5 Tage nach der Einspritzung	—
	1:200 000	† 3 „ „ „ „	—
	1:200 000	† 6 „ „ „ „	—
Nr. 3	1:100 000	das Meerschweinchen lebt	große Infiltration
	1:100 000	† 60 Std. nach der Einspritzung	—
	1:100 000	† 60 „ „ „ „	—
	1:200 000	† 23 „ „ „ „	—
	1:200 000	† 29 „ „ „ „	—
Nr. 4	1:100 000	das Meerschweinchen † 2½ Tage nach der Einspritzung	—
	1:100 000	lebt	kleine Infiltration
	1:200 000	† 2½ Tage nach der Einspritzung	—
	1:200 000	lebt	kleine Infiltration

Dabei stellte sich einmal heraus, daß bei der französischen Methode selbst Unterschiede im Werte von 1 : 100 000 und 1 : 200 000 nicht immer mit Sicherheit festzustellen waren (vgl. Tabelle 5). Weiterhin zeigte sich aber noch, daß das Resultat bei dieser Methode erst nach einer Woche ersichtlich ist, und daß zur Anstellung des Versuchs stets eine Anzahl Tiere gehören, ganz abgesehen davon, daß — wenn man, wie dies erörtert ist, bei der Bestimmung der Werte mit lebenden Kulturen arbeitet — gleichmäßig verlaufende Versuchsreihen nie sicher zu erzielen sind.

Diese Untersuchungen Madsens beweisen also die Ueberlegenheit der Ehrlichschen Methode in bezug auf Einfachheit, Schnelligkeit und Genauigkeit ebenso sicher, wie die an früherer Stelle (S. 39 ff.) besprochenen Experimente von Marx u. a. die Unrichtigkeit der Rouxschen Anschauung klarstellen, daß der präventive und kurative Effekt der Diphtherieheilsera besonders bestimmt werden müsse.

Die von Ehrlich im Jahre 1897 ausgearbeitete und vom Ministerium genehmigte Prüfungsvorschrift für die Wertbemessung

des Diphtherieserums, die seitdem nur geringfügige Aenderungen nicht grundsätzlicher Art erfahren hat, bestimmt zunächst, daß das als Maßstab für die Prüfung zu verwendende

Standardserum

in Form eines unter Ausschluß von Sauerstoff und Wasser konservierten Serumpulvers von genau bekanntem Wert in genau abgemessenen Quantitäten in besonders gearbeiteten Vakuumröhrchen (vgl. S. 45) vorrätig zu halten ist. Die zurzeit im Institut vorhandenen Apparate sind mit je 2 g eines Trockenantitoxins von 5925-facher Stärke gefüllt.

Die Auflösung des Serums hat, um eine möglichst genaue Haltbarkeit zu gewährleisten, in einer Mischung von $^2/_3$ Glyzerin und $^1/_3$ 0,85-proz. Kochsalzlösung zu erfolgen. Alle 2 Monate ist ein Röhrchen zu öffnen und eine Lösung herzustellen. Bei dem jetzt gebrauchten Trockenserum wird der Inhalt eines Röhrchens in 1185 ccm des genannten Gemisches gelöst und so eine Testserumlösung gewonnen, die in jedem Kubikzentimeter genau 10 IE. enthält.

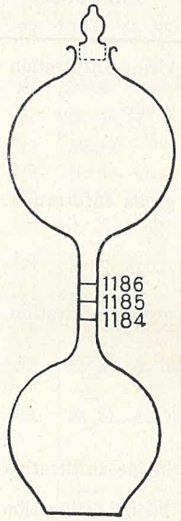

Fig. 6.

Bei der Lösung des Serums sind gewisse Vorsichtsmaßregeln zu beobachten. Man verfährt am besten in folgender Weise: Zunächst mißt man eine gewisse Menge physiologischer Kochsalzlösung ab, etwa 150 ccm, und löst den Inhalt des Röhrchens in einer bestimmten Menge der abgemessenen Flüssigkeit in einem Fläschchen auf. Wenn sich das Serum vollständig gelöst hat, gießt man es in den sogenannten „Mischkolben", indem man mehrmals das Fläschchen mit dem Rest der abgemessenen Mengen physiologischer Kochsalzlösung nachspült. Die weitere Mischung mit dem Glyzerin erfolgt in diesem „geeichten" Mischkolben (siehe Fig. 6). In dieses Gefäß wird, um möglichst die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, mittels eines langen, tief in das Gefäß reichenden Trichters unter langsamem Emporziehen des letzteren so viel Glyzerin und Kochsalzlösung im Verhältnis 2 : 1 zugetan, bis die Flüssigkeit genau die Marke 1185 erreicht. Nach Verschluß des Kolbens und mehrmaligem Umschütteln läßt man das Serum in dem Schüttelkolben 24 Stunden stehen. In der Regel sinkt in dieser Zeit durch das Aufsteigen der beim Einfüllen unvermeidlichen kleinsten Luftblasen die Flüssigkeit um etwa $^1/_2$ ccm. Der Inhalt des Kolbens wird daher am nächsten Tage mit Kochsalzlösung genau wieder bis zur Marke 1185 gefüllt und nochmals durchgeschüttelt. Die Lösung stellt dann die fertige, 2 Monate gültige Standardlösung dar, welche nun zunächst mit dem derzeitigen Testgift geprüft wird. Als

Testgift

können grundsätzlich sowohl flüssige wie feste Diphtheriegifte verwendet werden, wenn bei ihnen die weiter unten (S. 72) definierten Grenzwerte scharf zu ermitteln sind. Kommen flüssige, durch Toluol konservierte Gifte zur Verwendung, so soll dies nur geschehen, wenn durch längere Voruntersuchungen die Haltbarkeit der Prüfungskonstanten erwiesen ist und wenn ferner die Prüfungsdosis 1 ccm nicht überschreitet.

Die bei den Serumprüfungen zu gebrauchende Testgiftdosis wird mit Hilfe einer Immunitätseinheit ermittelt, die in 1 ccm einer 10-fachen Verdünnung der im vorigen Abschnitt erwähnten Testserumlösung enthalten ist. Es wird diese Serummenge mit steigenden Mengen Gift versetzt und durch eine genaue Versuchsreihe der Grenzwert ermittelt, bei dem gerade ein den Tod des Versuchstieres am 4. Tage herbeiführender Giftüberschuß manifest wird. Das so ermittelte Giftquantum stellt die Prüfungsdosis dar.

Das Testgift ist alle 2 Monate mit der Testserumdosis zu kontrollieren, indem jedesmal die Prüfungsdosis neu ermittelt wird. Sollte bei einer solchen Nachprüfung sich eine erheblichere Abweichung von der früheren Prüfungsdosis herausstellen, so ist das Gift als in Zersetzung befindlich anzusehen und durch ein neues zu ersetzen.

Gegenwärtig werden bei der Diphtherieserumprüfung ausschließlich flüssige, mit Toluol konservierte Gifte benutzt, da die Herstellung von Diphtherie-Trockengiften äußerst schwierig ist (Ehrlich, 53).

Die Herstellung eines brauchbaren Giftes gelingt nicht immer ganz leicht und soll daher kurz beschrieben werden.

Zur Giftgewinnung gehört in erster Linie eine gut giftbildende Kultur. Da nur solche Kulturen ein kräftiges Gift bilden, welche auf der Oberfläche der Bouillon wachsen, muß man die zu verwendende Kultur unter Umständen erst an reines Oberflächenwachstum gewöhnen, indem man sie möglichst häufig überimpft und dabei stets nur an der Oberfläche gewachsene Partikelchen zur Weiterzüchtung verwendet. Als Nährboden wird schwach alkalische Bouillon ohne Kochsalzzusatz benutzt.

Da die genaue Einstellung der Gifte sehr mühsam ist und einen großen Aufwand an Zeit und Tiermaterial erfordert, empfiehlt es sich, gleichzeitig immer große Mengen Gift zu bereiten. In der Regel werden von uns 20 Kolben (à 500 g Bouillon) beimpft, zumal man auch damit rechnen muß, daß ein Teil der Kolben sich später wegen ungenügender Giftbildung als unbrauchbar erweist. Die Kulturen bleiben 16 bis 20 Tage bei 37°. Nach dieser Zeit werden sämtliche Kolben, soweit sie typisches Wachstum zeigen, herausgenommen und umgeschüttelt, so daß die Bakterien zu Boden fallen. Haben sich die Bakterien gesenkt, so erfolgt die Umfüllung der Bouillon in 1 Liter-Kolben, wobei man nach Möglichkeit das Mitfließen der Bakterien selbst zu vermeiden sucht. Nachdem die Kolben mit einer $1^1/_2$—2 cm dicken Toluolschicht überschichtet sind, werden sie einige (2—3) Tage hindurch mehrmals täglich kräftig geschüttelt und

bleiben dann 2 Tage stehen. Diese Zeit genügt, um alles Toluol sich über dem Gift sammeln zu lassen und die noch in der Bouillon enthaltenen Bakterien vollständig abzutöten, wie dies eine nachfolgende Sterilitätsprüfung zu ergeben hat. An die Sterilitätsprüfung schließt sich gleichzeitig eine orientierende Giftigkeitsprüfung der einzelnen Kolben an. Der Inhalt aller genügend wirksam befundenen Kolben wird dann zusammen in ein größeres Gefäß gegossen und wieder mit einer hohen Schicht Toluol überschichtet. In diesem Gefäß, das im Eisschrank gegen Licht geschützt (Papierumhüllung) aufzubewahren ist, verbleibt das Gift, bis es eingestellt wird, stehen, nachdem das „Gesamtgift" vorher noch einmal durchschüttelt und auf Sterilität und seine ungefähren Giftwerte geprüft ist. Zu letzteren Versuchen füllt man sich zweckmäßig mit langer Pipette ein bestimmtes (größeres) Quantum ab, um nicht fortwährend das Hauptgefäß öffnen zu müssen. Die Korken der Gefäße, in denen das Gift aufbewahrt wird, werden mit Paraffin abgedichtet.

Tabelle 6.

Einstellung der absolut tödlichen Dosis.

Dosis	Datum des Versuches						
	18. 10. 04	25. 10. 04	31. 10. 04	5. 11. 04	23. 1. 05	13. 10. 05	17. 11. 05
0,001	lebt	.	.	.	.	.	.
0,0015	.	.	.	.	.	.	.
0,002	lebt	lebt	.	.	.	.	.
0,0025	.	„	lebt	lebt	lebt	.	.
0,003	lebt	„	† 4	„	„	lebt	.
0,0035	.	„	† 4	† 3½	† 6½	„	lebt
0,004	† 4	† 3	† 4	† 3½	† 4½	„	„
0,0045	.	† 3	lebt	† 3	† 2	„	„
0,005	† 3	† 2	† 2	† 2	† 2	† 4½	† 4
0,0055	.	.	.	.	.	† 3	† 3
0,006	.	.	.	.	.	† 2	† 2

Die absolut tödliche Dosis wird ermittelt, indem von dem Gifte eine Verdünnung z. B. von 1 : 1000 oder 1 : 500 hergestellt wird und von dieser Verdünnung steigende Dosen Meerschweinchen subkutan injiziert werden. Die Ermittelung dieser Dosis kann bei den individuellen Verschiedenheiten der Tiere mitunter schwierig sein.

Ehe ein Gift nun endgültig als Testgift eingestellt wird, lassen wir es ungefähr ein Jahr lagern. Nach dieser Zeit ist die Umlagerung der Toxine usw. in der Regel abgelaufen, und die nunmehr ermittelten Prüfungsdosen zeigen sich (wie dies bereits eingangs erörtert wurde) lange Zeit hindurch unverändert. Zur genauen Charakterisierung wird außer der Prüfungsdosis ($L_{\dagger}$) stets auch die L_0- und die absolut tödliche Dosis des Giftes ermittelt.

Die Tabellen 6 bis 8 zeigen als Beispiel die Resultate der einzelnen Versuche, die bei der Einstellung des Giftes Nr. 9 (vgl. Tabelle 3) angestellt wurden. Die absolut tödliche Dosis betrug Ende 1904 0,004 bzw. Ende 1905 0,005 ccm, die L_0-Dosis 0,18 ccm und die $L_{\dagger}$-Dosis (Prüfungsdosis) 0,27 ccm bzw. Ende 1908 0,29 ccm.

Tabelle 7.

Einstellung der L_0-Dosis.

Dosis	Datum des Versuches	
	9. 10. 04	3. 12. 05
0,15	glatt	glatt
0,16	fast glatt	fast glatt
0,17	zu wenig	zu wenig
0,18	L_0	L_0
0,19	zu stark	zu stark
0,2	leichtes Oedem	zu stark
0,21	Oedem	Oedem

Die L_0-Dosis wird in der Weise ermittelt, daß zu 1 IE. steigende Dosen Gift hinzugefügt und die Gemische Meerschweinchen subkutan injiziert werden. Das Tier mit der L_0-Dosis müßte am 4. Tage „glatt" sein (vgl. S. 65). Wenn man alle Tiere am 2. Tage tötet, läßt sich mit Sicherheit diejenige Reaktion feststellen, die erfahrungsgemäß gerade für L_0 hinreicht.

Tabelle 8.

Einstellung der $L_{\dagger}$-Dosis.

Dosis des Giftes in ccm	Datum des Versuches										
	14. 10. 1904	18. 10. 1904	24. 10. 1904	3. 11. 1904	23. 1. 1905	25. 2. 1905	18. 3. 1905	15. 4. 1905	11. 8. 1905	10. 10. 1905	9. 12. 1905
0,25	lebt	lebt	.	.	.	.	.	.	.	.	.
0,26	„	„	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt
0,265	.	† 3½	„	„	† 4	„	„	„	„	„	„
0,27	† 4	† 4	† 4½	† 4	† 3½	† 4	† 3½	† 4	† 4	† 4	† 4
0,275	.	† 3	† 3	† 4	† 3	† 2½	† 3	† 3	† 3½	† 3½	† 3
0,28	† 3½	† 3	† 2	† 2	.	.	.	.	† 3	† 3	† 4
0,29	† 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
0,3	† 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Die $L_{\dagger}$-Dosis wird in der Weise ermittelt, daß zu 1 IE. steigende Dosen Gift hinzugefügt und die Gemische Meerschweinchen subkutan injiziert werden. Die $L_{\dagger}$-Dosis muß so viel Giftwirkung entfalten, daß die Tiere am 4. Tage akut unter typischem Befunde eingehen (lokales hämorrhagisches Oedem, Schwellung der regionären Drüsen, seröse Ergüsse, speziell in Pleura, Perikard und Peritoneum, hochgerötete Nebennieren).

Zur

Ausführung der Wertbemessung

wird unter Verwendung von Präzisionspipetten eine Verdünnung des zu prüfenden Serums hergestellt, die, nach den Angaben der Fabrik über die Wertigkeit des Serums berechnet, in 4 ccm 1 IE. enthält. Da die Testgiftdosis auf 1 ccm des einfachen, also 4 ccm eines $^1/_4$-fachen Normaldiphtherieserums eingestellt ist, wird bei einem Serum von x-facher Stärke die Verdünnung 1 : 4x (beispielsweise bei einem 400-fachen Diphtherieserum 1 : 1600 und bei einem 500-fachen 1 : 2000) betragen müssen. Man nimmt zum Versuch 4 ccm der Verdünnung 1 : 4x statt 1 ccm der Verdünnung 1 : x, um auf diese Weise die kleinen Fehler, die durch das spätere Umfüllen der Flüssigkeit in die Spritze entstehen, auf ein Minimum zu reduzieren.

Mit 4 ccm dieser Serumverdünnung 1 : 4x wird die ebenfalls mit einer Präzisionspipette genauestens abgemessene Gebrauchsdosis des Testgiftes (s. oben) durch Umschütteln des mit einem sterilen Korken versehenen Fläschchens gut vermischt. Die Mischung wird sogleich einem Meerschweinchen von 250 g (höchstens 280 g) subkutan injiziert. Man wählt dazu am zweckmäßigsten eine Kochsche Spritze mit abgestumpfter Kanüle. Letztere wird in die linke Achselfalte eingestochen und vorsichtig rein subkutan bis zur Mitte des Bauches eingeführt, wo unter Vermeidung jedes Lufteindringens die Flüssigkeit injiziert wird.

Das Versuchstier ist bei glattem Verlauf 4, sonst 6 Tage lang zu beobachten. Stirbt es innerhalb der ersten 4 Tage, so besitzt das Serum nicht den angegebenen Wert. Stirbt es am 5. oder 6. Tage, so steht das Serum knapp an der Grenze des Zulässigen; in diesem Falle ist der Fabrik, um die voraussichtlich bald nötig werdende Einziehung zu vermeiden, eine 5—10 Proz. betragende Aufbesserung zu empfehlen. Indurationen, die möglicherweise bei den Versuchstieren an der Impfstelle am letzten Versuchstage noch bestehen, sollen keinen Grund zur Beanstandung bilden. Jedes gestorbene Tier ist zu sezieren wobei besonders auf interkurrente Krankheiten (Tuberkulose, Pseudotuberkulose, Seuchen) zu achten ist, die eine Ueberempfindlichkeit hätten bedingen können.

Tabelle 9 gibt das Protokoll einer Diphtherieserumprüfung wieder.

Ist das Versuchstier in der vorgeschriebenen Beobachtungszeit am Leben geblieben und dadurch die Neutralisierung der Testgiftdosis durch die dem angegebenen Wert entsprechende Serumverdünnung bewiesen, und hat ferner die nach den früher (S. 33) geschilderten Grundsätzen durchgeführte Unschädlichkeitsprüfung zu einer Beanstandung keinen Anlaß gegeben, so wird das Serum zum Verkehr zugelassen.

Um eine etwaige spätere Abschwächung festzustellen, werden in Deutschland alle Diphtheriesera 6 Monate und ebenso ein Jahr nach ihrer Zulassung einer erneuten Wertigkeitsprüfung unterzogen. Um mehr als 10 Proz. abgeschwächt befundene Sera werden auf Grund einer amtlich veröffentlichten Ministerialverfügung eingezogen. Ebenso werden alle nach Ablauf der staatlichen Gewährsdauer[1]) noch im Verkehr befindlichen Diphtheriesera serienweise zur Einziehung bestimmt.

Daß mit Phenol versetzte und sachgemäß abgefüllte und verschlossene Sera (Vermeidung der oxydierenden Wirkung eines größeren Luftquantums und Verhütung bakterieller Verunreinigung), wenn sie nicht direkt Schädigungen durch Licht und Wärme ausgesetzt werden,

1) Die staatliche Gewährsdauer, deren Ablauftermin auf jeder Packung angegeben sein soll, beträgt zurzeit 3 Jahre, wird aber voraussichtlich demnächst auf 5 Jahre erhöht werden.

Tabelle 9.

Diphtherieserum *Höchst* **Kontr.-Nr.** *2517*

Pferde-Nr. *118, 165, 171*

Datum der Blutentziehung: *11. u. 22. 6. 1920.*

Eingesandte Serummenge: *5 l* Angegebener Wert: *500* IE.

Aussehen des Serums: *klar* Eiweißgehalt: *8,08* %

27. 7. 20. **Prüfung auf Unschädlichkeit**

a) Maus:	b) Meerschweinchen:	c) kulturell:	
	Nr. 852	1. Agarplatte	*steril*
Subkutan: *0,5* ccm	Subkutan: *10* ccm	2. Bouillon	
mäßiges Zittern	*lebt*	3. anaërob	

Wertbestimmung auf *500* **IE.**

Meerschweinchen: *Nr. 853* Gewicht: *260 g*

27. 7. 20. Subkutan: *4* ccm *2000* f. Serumverdünnung

+ *0,13* ccm Testgift

28. 7.	*kl. Strang*	*270 g*
29. 7.	*„ „*	*270 g*
30. 7.	*fast glatt*	*270 g*
31. 7.	*glatt*	*270 g*

Bemerkungen:

Zugelassen am: *1. 8. 20.*

im allgemeinen praktisch unbegrenzt haltbar sind, jedenfalls nur einen ganz geringgradigen und allmählichen Antitoxinverlust zeigen, haben Marx, Otto und Boehncke festgestellt. Marx (111) teilte mit, daß von 1104 Prüfungsnummern wegen einer Abschwächung um mehr als 10 Proz. des Antitoxingehaltes bei den vorgeschriebenen Nachprüfungen nur 34 (= etwa 3 Proz.) zurückgezogen werden mußten. Zu etwa der gleichen Prozentzahl kam Boehncke (27) bei den Nachprüfungen der Jahre 1908—1913. Er fand den Antitoxinwert noch bei 12-jährigen Diphtherieseris nahezu unverändert. Otto (141) berichtete, daß auch tropische Einflüsse an sich die Antitoxine nicht beeinträchtigen. Die Haltbarkeit der Tetanussera ist nach Boehncke (27) ebenso zu bewerten.

Mit der Nachprüfung von Stichproben der an die Apotheken ausgegebenen Sera auf Keimfreiheit sind mehrere Krankenhäuser beauftragt. Ist auf Grund ihrer Untersuchungen die Annahme gerechtfertigt, daß bei einer größeren Menge desselben Serums später eine bakterielle Verunreinigung eingetreten ist — was nur sehr selten bisher der Fall war —, so wird seitens der benachrichtigten staatlichen Prüfungsstelle die sofortige Einziehung der betreffenden Serumkontrollnummer in die Wege geleitet.

Die Bestimmung des Diphtherieantitoxins in kleinsten Mengen.

Während die Ehrlichsche Wertbemessung für Diphtherieantitoxin, das in einigermaßen reichlicher Menge in einem Serum enthalten ist, an Einfachheit und Genauigkeit unübertroffen ist, wird sie beim Vorhandensein kleinerer Mengen als 0,1 Diphtherieantitoxin in 1 ccm Serum undurchführbar. Mit ihrer Hilfe konnten also manche, besonders klinisch wichtigen Fragen nicht studiert werden, wie z. B. das Vorkommen von Diphtherieantitoxin im Blut normaler Tiere, Bestimmung des Resorptionsverlaufs und der Ausscheidung des Diphtherieantitoxins, Auswertung des Gehaltes an spezifischen Schutzkörpern im Serum Diphtheriekranker und Schutzgeimpfter u. a. m. Jetzt stehen uns dafür zwei sehr subtil arbeitende Methoden zu Gebote. Bei beiden wird als Indikator in der Hauptsache die lokale Giftwirkung des Diphtherietoxins benutzt. Die erste dieser Methoden stammt von Marx, der sie in Gemeinschaft mit Ehrlich ausarbeitete und sich der subkutanen Injektion des Gift-Serum-Gemisches bediente. Bei der zweiten, von Römer angegebenen Methode ist die subkutane Impfung durch die intrakutane ersetzt.

Marx (112) benutzte als Grundlage die Tatsache, daß noch weit untertödliche Giftmengen an der Injektionsstelle ödemerregend wirken können. Durch Mischen von Toxinverdünnungen mit antitoxinhaltigem Serum werden diese Lokalreaktionen bei entsprechendem Gehalt an Antitoxin verhütet. Je kleiner die Giftmenge ist, die zur Oedembildung ausreicht, d. h. also je stärker die Giftwirkung des benutzten Toxins ist, um so kleiner ist die zur Paralysierung benötigte Antitoxinmenge. Eine conditio sine qua non, um kleinere oder kleinste Antitoxinmengen bestimmen zu können, ist also ein stark wirkendes Toxin. Marx operierte mit

Giften, von denen $^1/_7$ bzw. $^1/_2$ der Dosis letalis zur Oedemwirkung genügte. Seine Methodik gestaltet sich folgendermaßen: Nach Herstellung der hohen Toxinverdünnung wird je 1 ccm davon mit 1 ccm der zu prüfenden Serumverdünnungen in kleinen Fläschchen gemischt und die Mischung 2 Stunden bei 37° und danach 22 Stunden im Eisschrank der Bindung überlassen. Nach Ablauf dieser zum sicheren Reaktionsablauf zwischen Toxin und Antitoxin nötigen Zeit wird ein möglichst kleines Quantum der Mischung (0,5, jedoch nie mehr als 0,6 ccm) einem Meerschweinchen unter die Bauchhaut streng subkutan injiziert. Neben jedem Versuchstier muß ein Kontrolltier mit der betreffenden Giftmenge in Kochsalzverdünnung — ohne Serumzusatz — behandelt werden. Bei Verwendung nicht zu kleiner Tiere und möglichst geringer Flüssigkeitsmengen (0,2 ccm) kann man, wie dies Boehncke stets gelang, ohne Beeinträchtigung der Schärfe der Reaktion bei einem Tier 4 Injektionen ausführen. Nach Verlauf von 48 Stunden werden die Versuchstiere getötet. Marx konnte mit einem hochwirksamen Toxin, dessen ödemerzeugende Menge 0,0005 ccm = $^1/_{10}$ der absolut tödlichen Dosis betrug, den Antitoxingehalt des Serums noch bestimmen, wenn dieser mindestens $^1/_{240}$ IE. in 1 ccm war, wie folgende Versuchsreihe zeigt:

0,0005 Gift + Serumdosis	Erfolg
$^1/_{600}$ IE.	Injektionsstelle glatt
$^1/_{800}$ "	dgl.
$^1/_{1000}$ "	Injektionsstelle glatt, minimale Rötung
$^1/_{1200}$ "	dgl.
$^1/_{1500}$ "	Oedem schwächer als Kontrolle
$^1/_{2000}$ "	Starkes Oedem, wie Kontrolle
Kontrolle	dgl.

Hiernach genügte also $^1/_{1200}$ IE. zur Paralysierung von 0,0005 ccm Toxin. Da nur 0,2 ccm injiziert war, mußte das Serum bis $^1/_{240}$ IE. im Kubikzentimeter enthalten.

Salge (165) benutzte diese Methode zum Nachweis kleinster Mengen Antitoxin, welche Säuglinge mit der Ammenmilch eingeführt erhielten. Uffenheimer (175) bediente sich ihrer in abgeänderter Form mit Erfolg zum Nachweis von Diphtherietoxin im Blut diphtheriekranker Kinder, desgleichen Menabuoni (116).

Römer (155) hat im Behringschen Institut in Marburg unter Benutzung der exsudatbildenden und nekrotisierenden Eigenschaften des Diphtheriegiftes diese subkutane Methode durch eine intrakutane Methodik an Meerschweinchen ersetzt. Durch diese können, da hier noch kleinere Toxinmengen ($^1/_{250}$—$^1/_{500}$ der letalen Dosis) zur Reaktionserzeugung genügen, noch geringere Mengen Antitoxin bestimmt werden. Die Injektion wird am zweckmäßigsten an hellfarbigen Meerschweinchen mit einer 1 ccm-Spritze mit $^1/_{100}$-Teilung vorgenommen. Die exakt passende Nadel muß möglichst dünn und die Spitze kurz abgeschliffen sein, damit die Oeffnung der Nadel beim Vorschieben, das möglichst oberflächlich erfolgt, rasch durch die Haut gedeckt wird. Als Injektionsstelle benützt man die Seitenteile des Stammes. Die Haare werden mit einem die Haut nicht reizenden Enthaarungsmittel entfernt. Die injizierte Flüssigkeitsmenge soll 0,1 ccm betragen. Bei gelungener Injektion sieht man eine kleine Quaddel entstehen, die längere Zeit sichtbar bleibt. Die Reaktion entwickelt sich als Rötung und Infiltration innerhalb der ersten 24 Stunden und ist nach 48 Stunden noch deutlicher. Am 3. und 4. Tage bilden sich an der

Injektionsstelle mehr oder weniger intensive Nekrosen, die unter Borkenbildung abheilen. Die Tiere werden 7 Tage lang beobachtet. Die Entscheidung, ob die Reaktion positiv oder negativ ausgefallen, ist meist schon vorher möglich. An einem Tier können ohne Beeinträchtigung des Resultates bis zu 6 Injektionen vorgenommen werden. Zur Auswertung wird 1 ccm der sicher wirksamen Toxinverdünnung, deren Wert nach Ehrlich bekannt ist, mit je 1 ccm verschiedener Verdünnungen des zu untersuchenden Serums gemischt. Diese Mischungen läßt man, wie oben beschrieben, 1 Stunde binden. 0,1 ccm wird dann intrakutan injiziert. Römer vermochte so mit einem Toxin, dessen wirksame Dosis 0,00001 war, noch $^1/_{4000}$ IE. zu bestimmen. Die Methode bewährte sich später auch seinen Mitarbeitern Sames und Somogyi. Auch Karasawa und Schick (75), B. Hahn (70), Blumenau (25), Viereck (178), Kissling (76), Kleinschmidt (78), R. Otto (142), Blumenthal (26) u. a. benutzten sie mit Erfolg bei quantitativen Bestimmungen des Resorptionsverlaufes subkutan bzw. per os eingeführten Diphtherieheilserums und bei Untersuchungen über den Gehalt des Serums an Diphtherieantitoxin bei diphtherie- und masernkranken Kindern, gesunden Erwachsenen, Rekonvaleszenten und Bazillenträgern.

2. Die Prüfung des Tetanusserums.

Die amtliche Prüfung ist vorgeschrieben für alle flüssigen und festen Tetanussera.

Flüssiges Tetanusserum soll klar sein und darf höchstens einen geringen Bodensatz zeigen. Serum mit starker bleibender Trübung oder stärkerem Bodensatz darf nicht zum Verkehr zugelassen werden. Es muß 0,5 Proz. Karbolsäure oder 0,4 Proz. Trikresol enthalten. Das flüssige Serum muß als solches unmittelbar dem Tierkörper entstammen. Das Eindicken von Serum oder das Auflösen von festem Serum in flüssiges ist den Gewinnungsstätten nicht gestattet. Der Eiweißgehalt darf 12 Proz. nicht übersteigen.

Festes Tetanusserum soll gelblich sein und mehr oder minder durchscheinende Blättchen oder ein gelblich-weißes Pulver darstellen, das sich in der 10-fachen Menge Wasser von Zimmertemperatur binnen einer halben Stunde zu einer in Farbe und Aussehen dem flüssigen Serum entsprechenden Flüssigkeit löst. Es wird in Vakuumröhrchen aufbewahrt. Einen Zusatz irgendeines konservierenden Mittels darf solches Serum nicht enthalten.

Die Prüfung im Institut für experimentelle Therapie erfolgt einmal in der auf S. 33 beschriebenen Weise auf seine Unschädlichkeit sowie den Eiweißgehalt und zweitens auf seinen Wertgehalt.

Flüssige Tetanussera dürfen nur in den Verkehr gebracht werden, wenn sie im Kubikzentimeter mindestens 4 oder 6 IE.[1]) enthalten,

1) Für die Dauer des Krieges war auch die Ausgabe von Tetanusserum mit einem Gehalt von 2 und 3 IE. im Kubikzentimeter für Schutzimpfungen gestattet.

feste Tetanussera nur dann, wenn der Mindestgehalt im Gramm 40 oder 60 IE. beträgt. Wird der von der Herstellungsstätte angegebene Wert bei der amtlichen Prüfung nicht bestätigt, so wird das Serum zu dem bei letzterer festgestellten Wert zugelassen, sofern dieser noch den ebengenannten Mindestwert erreicht.

Alle im Verkehr befindlichen Tetanussera sind nach einem Zeitraum von 2 Jahren einer Nachprüfung zu unterziehen, die sich bei flüssigem Serum auf Klarheit und Wert, bei festem auch auf die Löslichkeit zu erstrecken hat. Bei einer Abschwächung, die mehr als 10 Proz. des anfänglichen Wertes beträgt, findet die Einziehung des betreffenden Serums statt. Nach Ablauf von 3 Jahren werden alle flüssigen Sera wegen Ablaufs der staatlichen Gewährsdauer serienweise eingezogen. Feste Tetanussera werden auch 4 Jahre nach ihrer Ausgabe nochmals nachgeprüft.

Die amtliche Wertbestimmungsmethode schließt sich im großen und ganzen eng an die v. Behringsche Methode an.

v. Behring (10, 11, 15) verfuhr bei der Wertbemessung in folgender Weise: Er stellte sich von dem zu prüfenden Serum mit physiologischer Kochsalzlösung eine 100-fache Verdünnung her (1 + 99). Von dieser Verdünnung brachte er 1 ccm in ein Erlenmeyersches Kölbchen, das 38 ccm destilliertes Wasser enthielt, und fügte 1 ccm seines Prüfungsgiftes (Testgift Nr. 5 = $^1/_{10}$ normal) hinzu. Nach gleichmäßiger Verteilung durch Umschütteln ließ er das Gemisch 30 Minuten stehen und injizierte dann einer Maus von mittlerem Gewicht 0,4 ccm subkutan. Blieb die Maus ganz gesund, so besaß das geprüfte Serum in 1 ccm mindestens 10 Antitoxineinheiten, da 1 ccm der Verdünnung 1 : 100 1 ccm des $^1/_{10}$ Normalgiftes vollkommen neutralisiert hatte. Wurde die Maus nach der Injektion dieser 0,4 ccm tetanisch, so enthielt das Serum natürlich weniger als 10 AE., und starb die Maus, so bot die Schnelligkeit, mit welcher der Tod eintrat, Anhaltspunkte für die Beurteilung, ob sein Wert annähernd so hoch oder wesentlich geringer war. Die genaue Wertbestimmung des Serums, d. h. die Ermittelung der Mischung, bei der die Maus nach Injektion von 0,4 ccm vollkommen gesund blieb, erfolgte dann durch weitere Versuche. War auf diese Weise der L_0-Wert des Serums festgestellt, so ließ sich durch einfache Berechnung der Wert des Serums ermitteln. Diejenige Serumdosis, welche in 0,4 ccm Flüssigkeit mit 0,01 ccm Testgift Nr. 5 L_0 gab, war genau gleich $^1/_{1000}$ AE.

Von dieser Versuchsanordnung ausgehend, ist die amtliche Wertbemessungsmethode ausgearbeitet. Die Schwierigkeiten, die bei der Tetanusserumprüfung zu überwinden waren, wurden einmal dadurch verursacht, daß hier das Vereinigungsbestreben zwischen Toxin und Antitoxin ein sehr geringes ist. Infolgedessen schwankte die Menge des bei der Einwirkung von Gift und Gegengift entstehenden neutralen Gemisches

in hohem Grade, je nach der Länge der Reaktionszeit und der Konzentration der Lösungen. Um die hierdurch bedingten Fehlerquellen auszuschalten, war es notwendig, stets unter völlig gleichen Bedingungen in bezug auf Zeit und Verdünnung der Lösungen zu arbeiten und vor allem die Versuchsreihen stets unter gleichzeitiger Kontrolle eines Standardserums anzusetzen.

Eine weitere Schwierigkeit verursachte die Labilität des Giftes. Notgedrungen mußte man früher bei der Prüfung in der Weise vorgehen, daß man zu jeder Prüfung eine gewisse abgewogene Menge Trockengift jedesmal frisch löste und zentrifugierte. Durch diese Manipulationen wurde natürlich die Prüfungsarbeit nicht unwesentlich erschwert. Man war daher bemüht, wie beim Diphtheriegift, so auch beim Tetanusgift ein Konservierungsverfahren für flüssige Testgifte zu finden. Allein alle Versuche nach dieser Richtung verliefen negativ. Es gelang, diese Schwierigkeiten zu beseitigen durch Ausdehnung der EHRLICHschen Serumkonservierungsmethode auf das Testgift.

Die Herstellung und Konservierung des Tetanusgiftes geschieht nach MARX (111, 114) zweckmäßig in folgender Weise: Zur Giftbereitung beimpft man große Kolben Traubenzuckerbouillon mit reichlichem Tetanusmaterial (Bazillen oder Sporen) und hält die nach Wasserstoffdurchleitung luftfrei gemachten Kolben 8 Tage bei 37° C. Ergibt dann die Prüfung der Bouillon eine Reinkultur, so wird das Eiweiß mit Ammoniumsulfat ausgesalzt, abgeschöpft und auf einem Tonteller im Exsikkator getrocknet.

Das als Testgift zu verwendende Tetanustoxin ist nach Möglichkeit von Sporen zu befreien. Man kann dies durch Filtrieren erreichen. Schonender und deshalb empfehlenswerter ist jedoch die Ausfällung durch Ammoniumsulfat. Das frisch gewonnene Rohgift, das noch große Mengen Sporen enthält, und mit dem man deswegen äußerst vorsichtig umgehen muß, wird wieder in großen Mengen Kochsalzlösung gelöst und die Lösung scharf zentrifugiert (in einer Zentrifuge, die 4000 Runden in der Minute macht, 1 Stunde lang). Sodann wird die klare Flüssigkeit abgegossen und das Toxin von neuem durch Ammoniumsulfat ausgefällt, sogleich wieder gelöst und zentrifugiert. Dieses Verfahren muß in der Regel 3—4mal wiederholt werden. Auch etwaige weitere Wiederholungen führen nicht zu einer Abschwächung des Giftes. Schließlich wird das dann nahezu sporenfreie Tetanustoxin auf Tontellern im Vakuum getrocknet und pulverisiert. 1 Liter Kulturflüssigkeit ergibt etwa 5—6 g Trockengift.

Das auf diese Weise gewonnene trockne Tetanustoxin wird im Verhältnis von 1:2 in Wasser gelöst und dann mit Präzisionspipetten in genau gleichen Dosen in die oben beschriebenen EHRLICHschen Vakuumröhrchen gefüllt. Die Beschickung der Apparate und die weitere Evakuierung erfolgt ganz in der gleichen Weise, wie es früher (S. 45)

für das Standardserum beschrieben wurde. Die Menge des einzufüllenden Giftes richtet sich nach den ermittelten Werten des Toxins. Der Inhalt des Röhrchens muß stets so gewählt werden, daß er, mit einer passenden Flüssigkeitsmenge gelöst, die für eine Prüfung nötige Giftlösung darstellt. Der Grad der Verdünnung und die Menge des einzufüllenden Giftes variieren daher natürlich und sind bei jedem neuen Testgift zunächst genau von neuem zu ermitteln. Bei unserem augenblicklich zur Anwendung gelangenden Gift sind die Röhrchen mit 0,5 ccm einer Giftlösung 1:2 beschickt und dann evakuiert worden. Das in jedem Röhrchen befindliche Trockengift stellt, in 27 ccm Wasser gelöst, unsere „Normaltestgiftlösung“ dar.

Es hat sich nun als äußerst praktisch erwiesen, in gleicher Weise wie das Prüfungsgift auch das Tetanusstandardserum in Mengen, wie sie für eine einzelne Prüfung nötig sind, zu evakuieren. Die Veranlassung hierzu gab die Erfahrung, daß das Tetanusantitoxin in Glyzerinkochsalzlösung, wie sie zur Konservierung des Diphtherieantitoxins gebraucht wird (vgl. S. 70), in seinem Wertgehalte nicht absolut konstant blieb, und die weitere Erwägung, daß es wenig rationell ist, zu diesen Prüfungsversuchen, die doch nur geringe Mengen Serum erfordern, relativ große abgewogene Mengen Serum vorrätig zu halten. Auch bei der Evakuierung solcher minimalen Mengen Serum hat sich nun das EHRLICHsche Konservierungsverfahren vortrefflich bewährt. Die jetzt im Gebrauch befindlichen Standardserumröhrchen sind mit so viel Serum (0,004 g eines 43-fachen Serums) gefüllt, daß der Inhalt, in 17 ccm Kochsalzlösung gelöst, in 1 ccm $^1/_{100}$ IE. enthält.

Die so konservierten Gifte und Sera sind nach den bisherigen Erfahrungen von einer in praktischer Beziehung unbegrenzten Haltbarkeit. Tetanusgifte erwiesen sich sogar dann völlig unverändert, wenn sie einen Monat im Brütschrank bei 37° C aufbewahrt waren.

Auf Grund der bestehenden Vorschriften wird die amtliche Prüfung des Tetanustoxins in folgender Weise ausgeführt:

Man öffnet zunächst in vorsichtiger Weise durch Abfeilen ein Standardserumröhrchen, füllt auf das in ihm enthaltene Serumpulver, das vorschriftsmäßig in 17 ccm Kochsalzlösung gelöst werden soll, mit einer graduierten Pipette znnächst 4 oder 5 ccm Kochsalzlösung ein und verschließt das Röhrchen wieder mit einem abgebrannten Korken. Wenn sich das Serum unter wiederholtem Umschütteln völlig gelöst hat, wird die Lösung in ein steriles Fläschchen abgegossen und das Röhrchen mit den restierenden 13 bzw. 12 ccm Kochsalzlösung so gründlich nachgespült, daß keine Spuren des Serums in ihm zurückbleiben. Man hat dann in dem Fläschchen 17 ccm einer Lösung des Standardserums, die in jedem Kubikzentimeter $^1/_{100}$ IE. enthält.

In ganz entsprechender Weise werden nach Oeffnung eines Toxinröhrchens aus dessen Inhalt 27 ccm Testgiftlösung (vgl. S. 81) hergestellt.

Nunmehr wird das zu prüfende Serum — nach vorhergehender Sterilitätsprüfung — dem von der Fabrik angegebenen Titer entsprechend so verdünnt, daß in 1 Kubikzentimeter der Verdünnung genau $^1/_{100}$ IE. enthalten sein müßte. Wenn dies geschehen ist, erfolgt die Ansetzung der Gift-Serum-Gemische in vitro. Hierzu sind 2 Reihen zu je 8 Fläschchen erforderlich. In die Fläschchen der ersten Reihe kommt, mit einer Präzisionspipette genau abgemessen, je 1 ccm Standardserumlösung, in die zweite Reihe je 1 ccm der von dem zu prüfenden Serum hergestellten Lösung.

Zu jeder Reihe gibt man steigende Dosen Toxin — bei dem jetzigen Toxin Dosen von 0,8 bis 1,5 — und so viel Kochsalzlösung, daß der Gesamtinhalt jedes Fläschchens 4 ccm beträgt. Aus praktischen Gründen wird zweckmäßig zuerst die Kochsalzlösung eingefüllt, dann die Serumverdünnung und zuletzt die Giftlösung. Es enthält dann

Röhrchen	Standardserumlösung	Giftlösung	Kochsalzlösung	Röhrchen	Verdünnung des zu prüfenden Serums	Giftlösung	Kochsalzlösung
1	1 ccm	0,8 ccm	2,2 ccm	9	1 ccm	0,8 ccm	2,2 ccm
2	„	0,9 „	2,1 „	10	„	0,9 „	2,1 „
3	„	1,0 „	2,0 „	11	„	1,0 „	2,0 „
4	„	1,1 „	1,9 „	12	„	1,1 „	1,9 „
5	„	1,2 „	1,8 „	13	„	1,2 „	1,8 „
6	„	1,3 „	1,7 „	14	„	1,3 „	1,7 „
7	„	1,4 „	1,6 „	15	„	1,4 „	1,6 „
8	„	1,5 „	1,5 „	16	„	1,5 „	1,5 „

Die gut verkorkten Fläschchen bleiben $^1/_2$ Stunde bei Zimmertemperatur, gegen das Tageslicht durch Deckung mit Blechhülsen geschützt, stehen.

Nach dieser Zeit werden mit den angesetzten Gemischen 2 Reihen von je 8 weißen Mäusen von völlig gleichem Gewicht (15 g) infiziert, und zwar erhält jede Maus 0,4 ccm des einzelnen Gemisches subkutan unter die Haut des rechten Hinterfußes, also $^1/_{1000}$ IE. + steigende Dosen (0,08—0,15) Giftlösung.

Die Tiere werden 6 Tage lang beobachtet. An jedem Tag wird genau protokolliert, welcher Grad von Tetanus („Spur", „deutlich", „stark" usw., s. Tabelle) feststellbar ist. Bei längerer Erfahrung kann man die Grade der Giftwirkung nach dem Grade der Krümmung, die die am Schwanz hochgehaltenen Mäuse zeigen, recht scharf differenzieren. Hat das geprüfte Serum den angegebenen Titer, so müssen die Versuchsresultate in beiden Tierreihen genau zusammenfallen. Ist es dagegen schwächer, so tritt eine entsprechende Verschiebung der Ergebnisse ein, aus der man leicht ersehen kann, um wieviel

das betreffende Serum hinter dem von der Fabrik angegebenen Titer zurückbleibt.

Die Tabellen 10 und 11 zeigen den Verlauf zweier in dieser Weise ausgeführter Wertbestimmungen.

Tabelle 10.

Wertbemessung des Tetanusserums x am 19. 7.
Von der Fabrik angegebener Wert: 4 IE. in 1 ccm.

	Standardserum		Serum x	Standardserum		Serum x
	Maus 1	Dosis 0,08	Maus 9	Maus 5	Dosis 0,12	Maus 13
20. 7.	0		0	Spur		geringe Spur
21. 7.	0		0	leicht		Spur
22. 7.	0		0	leicht-deutlich		leicht
23. 7.	0		0	deutlich		leicht-deutlich
24. 7.	0		0	ziemlich stark		deutlich
25. 7.	0		0	stark		ziemlich stark
	Maus 2	Dosis 0,09	Maus 10	Maus 6	Dosis 0,13	Maus 14
20. 7.	?		0	leicht-deutlich		Spur
21. 7.	geringe Spur		?	dgl.		leicht
22. 7.	dgl.		geringe Spur	deutlich		leicht-deutlich
23. 7.	„		dgl.	ziemlich stark		deutlich
24. 7.	„		„	stark		ziemlich stark
25. 7.	„		„	† 6		stark
	Maus 3	Dosis 0,1	Maus 11	Maus 7	Dosis 0,14	Maus 15
20. 7.	geringe Spur		?	leicht-deutlich		leicht
21. 7.	dgl.		geringe Spur	deutlich		deutlich
22. 7.	Spur		dgl.	ziemlich stark		ziemlich stark
23. 7.	„		Spur	stark		stark
24. 7.	„		„	† 5		† 5
25. 7.	„		„	.		.
	Maus 4	Dosis 0,11	Maus 12	Maus 8	Dosis 0,15	Maus 16
20. 7.	geringe Spur		geringe Spur	deutlich		deutlich
21. 7.	Spur		dgl.	ziemlich stark		ziemlich stark
22. 7.	„		Spur	stark		stark
23. 7.	leicht		„	† 4		† 4
24. 7.	„		„	.		.
25. 7.	„		leicht	.		.

Ergebnis: zugelassen am 26. 7. als „4-fach".

Serum x (Tabelle 10) war von der Fabrik als „4-fach" zur Prüfung gestellt. Es war gemäß den Ausführungen auf S. 82 von ihm also eine 400-fache Verdünnung hergestellt worden, die bei der Richtigkeit der Wertangabe in jedem Kubikzentimeter $^1/_{100}$ IE. enthalten mußte. Es zeigte sich, daß diese Verdünnung den einzelnen Toxindosen gegenüber annähernd genau ebenso wirkte, wie die im Kubikzentimeter ebenfalls $^1/_{100}$ IE. enthaltende Standardserumlösung. Es war demnach bei diesem Serum der von der Fabrik angegebene Wert in der Tat vorhanden.

Tabelle 11.

Wertbemessung des Tetanusserums y am 26. 9.
Von der Fabrik angegebener Wert: 6 IE. in 1 ccm.

	Standardserum	Serum y	Standardserum	Serum y
	Maus 1 — Dosis 0,08	Maus 9	Maus 5 — Dosis 0,12	Maus 13
27. 9.	0	geringe Spur	Spur	deutlich
28. 9.	0	Spur	leicht	ziemlich stark
29. 9.	0	„	leicht-deutlich	stark
30. 9.	0	leicht	deutlich	† 4
1. 10.	0	leicht-deutlich	„	.
2 10.	0	deutlich	ziemlich stark	.
	Maus 2 — Dosis 0,09	Maus 10	Maus 6 — Dosis 0,13	Maus 14
27. 9.	?	Spur	leicht	ziemlich stark
28. 9.	geringe Spur	leicht	leicht-deutlich	stark
29. 9.	dgl.	leicht-deutlich	deutlich	† 3
30. 9.	„	deutlich	ziemlich stark	.
1. 10.	„	ziemlich stark	stark	.
2. 10.	„	stark	† 5.	.
	Maus 3 — Dosis 0,1	Maus 11	Maus 7 — Dosis 0,14	Maus 15
27. 9.	geringe Spur	Spur-leicht	leicht	stark
28. 9.	dgl.	leicht-deutlich	deutlich	agonel
29. 9.	Spur	deutlich	ziemlich stark	† 2¼
30. 9.	„	ziemlich stark	dgl.	.
1. 10.	„	stark	† 5	.
2. 10.	leicht	† 6	.	.
	Maus 4 — Dosis 0,11	Maus 12	Maus 8 — Dosis 0,15	Maus 16
27. 9.	geringe Spur	leicht-deutlich	deutlich	† 1
28. 9.	Spur	deutlich	ziemlich stark	.
29. 9.	„	ziemlich stark	stark	.
30. 9.	leicht	stark	† 4	.
1. 10.	„	† 5	.	.
2. 10.	„	.	.	.

Ergebnis: zugelassen am 3. 10. als „4-fach“.

Anders war das Ergebnis der Prüfung des angeblich „6-fachen“ Serums y (Tabelle 11). Die 600-fache Verdünnung dieses Serums wirkte, wie das Protokoll erkennen läßt, nicht in gleicher Weise wie die Standardserumlösung, sondern die Wirkung des Serums y gegenüber z. B. der Toxindosis 0,09 entsprach der Wirkung des Standardserums gegenüber 0,12 Gift, und bei 0,12 Toxin beeinflußte das Serum y das Tier in gleicher Weise wie das Standardserum bei einer Giftdosis von 0,15.

Durch das Verhältnis der Giftdosen, bei denen die Wirkung beider Sera gleich ist, wird auch das Verhältnis der beiden Serumwerte zueinander ausgedrückt. Es verhält sich also Serum y : Standardserum wie 0,09 : 0,12 oder wie 0,12 : 0,15. Man vermittelt nun durch Umrechnung dieser Verhältniszahlen, wie sich der Wert des geprüften Serums zu dem von der Fabrik angegebenen Wert verhält, dem entsprechend ja das Serum für den Prüfungsversuch verdünnt wurde. Es

ergibt sich dann für unseren Fall, daß das Serum y einem 6-fachen Serum gegenüber — als solches wurde es zur Prüfung gestellt — einen rund $4^1/_2$-fachen Wert aufweist, denn es verhält sich 0,09 : 0,12 wie 4,5 : 6 und 0,12 : 0,15 wie 4,8 : 6. Das Serum y konnte demgemäß nur als 4-faches Serum zugelassen werden.

Zum Schlusse seien noch die Wertbestimmungsmethoden kurz erwähnt, die in Amerika, Frankreich und Italien angewendet werden.

In Amerika wird das Tetanusantitoxin nach den Angaben von Rosenau und Anderson (158) an Meerschweinchen geprüft. Als Immunitätseinheit („U“ = Unit) zur Bestimmung des Antitoxins gilt das Zehnfache der geringsten Menge Tetanusserum, die gegenüber der offiziellen Testdosis des Standardtoxins Meerschweinchen von 350 g 4 Tage am Leben erhält. Die Testdosis des Giftes besteht in etwas weniger als 100 tödlichen Dosen, d. h. die Mischung von $^1/_{10}$ U mit 100 tödlichen Dosen enthält gerade genug freies Gift, um das Tier in 4 Tagen zu töten. Der Wert eines unbekannten Serums wird also indirekt durch das Toxin gemessen, indem der L_+-Wert als Testwert benutzt wird. Zur Prüfung werden Mischungen von steigenden Dosen einer 1000-fachen Antitoxinverdünnung (z. B. 0,001, 0,0015, 0,002, 0,0025, 0,003 ccm) und der Testgiftdosis, die man zur Bindung 1 Stunde hat bei Zimmertemperatur stehen lassen, in einer Gesamtflüssigkeitsmenge von 4 ccm Meerschweinchen von 350 g subkutan am Bauch, etwa in Nabelhöhe, injiziert. Die Zahl der im Serum enthaltenen Immunitätseinheiten ergibt sich aus der Menge Antitoxin, die das Tier bis zum Ablauf des 4. Tages am Leben erhält. 1 U entspricht etwa $^1/_{66}$ deutscher Immunitätseinheit.

In Frankreich, wo Tetanussera im Institut Pasteur in Paris und im Institut bactériologique in Lyon hergestellt werden, spritzt man — nach einer Mitteilung Arloings an Rosenau und Anderson (158) — einer Reihe von Meerschweinchen Serummengen ein, die $^1/_{500\,000}$, $^1/_{1000\,000}$, $^1/_{10\,000\,000}$, $^1/_{100\,000\,000}$ und $^1/_{1000\,000\,000}$ ccm entsprechen. 10—20 Stunden später wird diesen Tieren, zugleich mit Kontrolltieren, eine einfach tödliche Dosis Tetanusgift injiziert. Man bezeichnet den antitoxischen Wert eines Tetanusserums mit $^1/_{500\,000}$ usw., wenn das betreffende Tier die für das Kontrolltier tödliche Toxindosis überlebt. Die französischen Sera sind gewöhnlich $^1/_{1000\,000}$-wertig, sollen jedenfalls nicht unter $^1/_{500\,000}$-wertig sein.

In Italien wird — nach Tizzoni (174), mitgeteilt von Rosenau und Anderson (158) — an Kaninchen geprüft. Als Toxineinheit wird diejenige Giftmenge benutzt, die ein Kaninchen von 1 kg in 4—5 Tagen tötet. Mischungen dieser Giftdosis mit verschiedenwertigen, mit Kochsalzlösung hergestellten Antitoxinverdünnungen werden nach halbstündiger Bindung Kaninchen subkutan in den hinteren Schenkelteil eingespritzt. Der Titer des Serums wird nach der Mischung angegeben, die keine tetanischen Symptome bei dem betreffenden Tier mehr erkennen läßt.

3. Die Prüfung des Dysenterieserums.

Daß an Tieren in sachgemäßer Weise gewonnene Ruhrsera den dysenterischen Krankheitsprozeß beim Menschen in spezifischer Weise beeinflussen, wenn sie frühzeitig in genügend hohen Dosen angewendet werden, ist von verschiedenen Klinikern wiederholt berichtet worden.

Die Wirkung tritt am deutlichsten zutage, wenn es sich um die schweren toxischen Formen der Bazillenruhr handelt, deren Erreger der SHIGA-KRUSEsche Bacillus dysenteriae ist. Die heute im Handel befindlichen Ruhrsera sind entweder allein gegen das wohlcharakterisierte Gift dieses Ruhrerregers gerichtet, oder sie sind polyvalent, d. h. zur Immunisierung der Tiere werden außer dem ein lösliches Toxin bildenden SHIGA-KRUSEschen Bazillus auch Kulturen der sogenannten giftarmen Ruhrbazillen (Bac. dysenteriae Flexner und Y) verwendet.

Eine den Anforderungen der Praxis genügende Wertbestimmungsmethode für Dysenteriesera hat demgemäß in erster Linie den antitoxischen Wert des Serums gegenüber SHIGA-KRUSE-Toxin in exakter Weise festzustellen. Die Giftstoffe der giftarmen Typen der Ruhrerreger sind im Gegensatz zu dem letztgenannten Toxin so geringwertig, daß sie sich nicht zuverlässig genug bestimmen lassen.

Auch der Nachweis anderer Immunkörper in Ruhrseris, denen man vielleicht eine den therapeutischen Effekt mitbedingende Rolle zuschreiben könnte, gelingt nicht genau genug, um darauf eine einwandfreie Prüfungsmethode gründen zu können. Das gilt sowohl für die Agglutinine, wie für die Bakteriotropine (und Opsonine) und für die komplementbindenden Substanzen. Die Bestimmung der letzteren war von KOLLE, HELLER und DE MESTRAL (81) zur Wertbemessung der im Ruhrserum angenommenen antiinfektiösen Stoffe in Erwägung gezogen werden. Die Bakteriotropine hierzu heranzuziehen, hatte AUCHÉ (5) vorgeschlagen. Nach den Untersuchungen von BÄCHER und LAUB (7) ist jedoch die bakteriotrope Wirkung nicht gleichmäßig und ein quantitatives Ansteigen des Bakteriotropingehaltes im Verlauf der Immunisierung nicht immer festzustellen.

Ueber die beste Methode, in einem Serum die spezifischen SHIGA-KRUSE-Antitoxine zu bestimmen, traten erhebliche Meinungsverschiedenheiten auf. Das Meerschweinchen ist als Versuchstier nicht brauchbar (KOLLE, HELLER, DE MESTRAL, 81). VAILLARD und DOPTER (177) versuchten die antiinfektiöse Kraft ihres Serums in der Weise zu bestimmen, daß sie die Schutzwirkung des subkutan injizierten Serums gegenüber der subkutanen Einverleibung lebender Dysenteriekultur an Kaninchen von 2000 g Gewicht ermittelten. MOSES (122) prüfte den antitoxischen Wert seiner Sera am Kaninchen gegenüber der vielfach tödlichen Dosis Toxin (0,2). Die Neutralisierung dieser Dosis gelang im besten Falle noch mit 0,001 antitoxischem Serum. Rein bazilläres Ruhrserum zeigte nur minimalen Schutzwert. Bei kombinierter Immunisierung (Toxin + Bazillen) erreichte er ein Serum, das noch in einer Dosis von 0,005 schützte. Auch KRAUS und DÖRR (91) fanden, daß gegenüber dem Dysenterietoxin Kaninchen die größte und gleichmäßigste Empfindlichkeit besäßen. Sie bestimmen einmal nach EHRLICH durch den Mischungsversuch das Neutralisationsvermögen in vitro, indem

sie das Toxin-Antitoxin-Gemisch nach dem Durchschütteln zwecks vollständiger Bindung 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen und dann Kaninchen intravenös injizieren. Weiterhin ermitteln sie das Neutralisationsvermögen im Organismus, indem sie Toxin und Antitoxin gleichzeitig, aber getrennt (je in eine Ohrvene des Kaninchens) einspritzen. Schließlich prüfen sie noch die Heilwirkung durch Injektion des Serums kürzere oder längere Zeit nach der Gifteinverleibung, weil präventiver und kurativer Wert angeblich voneinander unabhängig sind. Nach dem Ergebnis dieser Prüfung werden im Wiener staatlichen Seruminstitut zur therapeutischen Verwendung nur solche Dysenteriesera zugelassen, die in Dosen von 0,1 ccm Kaninchen von 1000 g bei getrennter intravenöser Applikation gegen die einfach tödliche Giftdosis schützen. SCHOTTELIUS (166) empfahl ebenfalls die intravenöse Einspritzung der Toxin-Antitoxin-Gemische bei Kaninchen, ebenso neuerdings FUKUHARA (66).

KOLLE, HELLER und DE MESTRAL (81) erhielten bei Nachprüfung der Angaben von KRAUS und DÖRR nur bei Anwendung des Mischungsversuches in vitro einigermaßen gleichmäßige Ergebnisse an Kaninchen. Sie empfahlen auf Grund eingehender Versuche, die Prüfung der Dysenteriesera an weißen Mäusen mit Hilfe der Mischungsmethode vorzunehmen. Es gelang ihnen, durch das Serum auch Mäuse, denen die 4-fache sicher tödliche Dosis des Giftes intraperitoneal eingespritzt war, noch bis zu 6 Stunden nach der Gifteinverleibung am Leben zu erhalten, wenn das Serum die genügende Menge von Antitoxinen nach Maßgabe der Titrierung der Einheiten mittels der Gift-Serum-Mischungsmethode enthielt. Das Gift (Bouillongift, Waschwassergift, Aggressingift) wurde in mindestens 4-fach tödlicher Dosis mit fallenden Mengen des Serums versetzt, 10 Minuten im Reagenzglas bei Zimmertemperatur im Kontakt gelassen und dann intraperitoneal eingespritzt.

SHIGA (168, 169) bedient sich zur Wertprüfung seines multivalenten (durch kombinierte Immunisierung mit 5 Typen des Dysenteriebazillus gewonnenen) Ruhrserums folgender Methode: die 5-fach tödliche Menge lebender Dysenteriebazillenkultur wird mit absteigenden Serummengen versetzt und dann Mäusen intraperitoneal injiziert. Die Dosis letalis minima für eine Maus von 12—14 g beträgt etwa 0,08 mg virulenter Dysenteriekultur. Die Erhaltung der Virulenz gelingt gut, wenn die frisch isolierte Stammkultur sofort im Eisschrank konserviert wird. Zum Gebrauch wird davon eine Agarkultur angelegt. Von der 24-stündigen Kultur wird mit einer genau gemessenen besonderen Platinöse eine bestimmte Menge herausgenommen und in einer bestimmten Menge Kochsalzlösung aufgeschwemmt, so daß in 1 ccm genau 2,0 mg Kultur enthalten ist. Das Immunserum wird in folgenden Mengen in Reagenzgläschen gefüllt: 0,5, 0,25, 0,1, 0,025, 0,01 und 0,005 ccm. Alle Röhrchen werden mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ccm aufgefüllt.

Dazu kommt je 1 ccm Bazillenemulsion. Je 2 (12—14 g schweren) weißen Mäusen wird von dieser Mischung 0,4 ccm intraperitoneal injiziert. Das Resultat wird nach 24 Stunden beurteilt (s. auch untenstehende Uebersicht).

Dysenterieserum		Physiologische Kochsalzlösung	Bazillenemulsion	Aus der Mischung wird injiziert	In 0,4 der Mischung ist enthalten:	
					Serum	Bazillenmenge
2-fache Verdünnung	1,0 ccm	—	1,0 ccm = 2 mg	0,4	0,1	0,4 mg
	0,5 „	0,5	1,0	0,4	0,05	0,4 „
	0,25 „	0,75	1,0	0,4	0,025	0,4 „
20-fache Verdünnung	1,0 „	—	1,0	0,4	0,01	0,4 „
	0,5 „	0,5	1,0	0,4	0,005	0,4 „
	0,25 „	0,75	1,0	0,4	0,0025	0,4 „
	0,1 „	0,9	1,0	0,4	0,001	0,4 „

Von der Beobachtung ausgehend, daß Kaninchen auf das Dysenteriegift am besten bei intravenöser Injektion reagieren, hat dann Sachs (163) die Toxin-Antitoxin-Gemische weißen Mäusen intravenös eingespritzt und zusammen mit Georgi (164) eine Prüfungsmethode ausgearbeitet, die sich sehr bewährt hat. Sie wurde zunächst bei der Wertbestimmung der großen Mengen von Ruhrserum angewendet, die während des Krieges von der Heeresverwaltung an die Lazarette ausgegeben wurden, und wird auch jetzt noch zur Prüfung aller von den Serumfabriken eingesandten Dysenteriesera herangezogen.

Als Dysenterietoxine dienen Bouillongifte, die aus zwei- bis dreiwöchigen Bouillonkulturen des Shiga-Kruseschen Ruhrbazillus gewonnen werden. Die Bazillen werden mit Toluol abgetötet. Die Bouillongifte kommen erst nach langem Lagern unter Toluol zur Verwendung, wenn die Bazillen sich abgesetzt haben und dementsprechend die Bouillon völlig klar geworden ist. Die unter Toluol aufbewahrten, gut abgelagerten Gifte bleiben durch mehrere Jahre annährend gleichwertig.

Die Dysenterietoxine wirken, wie schon Kolle, Heller und de Mestral feststellten, bereits bei intraperitonealer Injektion auf Mäuse recht gleichmäßig. Bei intravenöser Einverleibung ist die Wirkung aber, wie vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Toxinen ergaben, noch stärker und regelmäßiger. Die individuellen Schwankungen in der Giftempfindlichkeit der einzelnen Tiere treten hier weniger in Erscheinung wie bei der intraperitonealen Injektion, wenn auf die Gleichheit des Gewichtes der Mäuse streng geachtet wird. Es zeigt sich darin also ein gleiches Verhalten, wie es Kraus und Dörr auch für Kaninchen nachwiesen. Die tödliche Dosis ist bei guten Toxinen so gering, daß unspezifische Wirkungen der Bouillonkultur als ausgeschaltet gelten können. Die Mäuse erliegen der Vergiftung bei intravenöser Injektion meist am 2. oder 3. Tage, seltener noch am 4. Tage. Gehen sie schon am 1. Tage ein, so sind dafür entweder interkurrente Ursachen oder Begünstigung anderer pathologischer Momente durch

die Toxininjektion verantwortlich zu machen. Dem Vergiftungstode gehen eine starke Reflexerregbarkeit und meist akut einsetzende Lähmungserscheinungen voraus. Oft sehen die Mäuse noch wenige Stunden vor dem Tode völlig gesund aus.

Das jetzt im Institut verwendete Dysenterietoxin tötet bei intravenöser Einspritzung Mäuse in der Regel in einer Menge von 0,0125 ccm; die sicher tödliche Dosis liegt etwas höher und beträgt 0,015—0,02 ccm. Als Prüfungsdosis wird 0,25 ccm einer 3-fachen Verdünnung (= 0,0833 ccm Gift) gebraucht, also etwa das 4-fache der einfach tödlichen Dosis.

Bei der Wertbestimmung der Sera werden fallende Mengen der letzteren, stets im gleichen Flüssigkeitsvolumen (0,25 ccm) enthalten, mit der Prüfungsdosis des Giftes vermischt. Die einzelnen Gemische werden nach $^1/_2$-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur weißen Mäusen intravenös eingespritzt. Der größte Teil der neutralisierenden Wirkung ist zwar schon erkennbar, wenn die Gemische sofort nach ihrer Fertigstellung injiziert werden, es hat sich aber als zweckmäßig erwiesen, der Injektion eine halbstündige Bindung vorhergehen zu lassen. Bei längerem Stehenlassen der verdünnten Lösungen würde man mit einer Abschwächung der Toxinwirkung rechnen müssen.

Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß das Neutralisationsvermögen der einzelnen Serumpräparate gegenüber verschiedenen Toxinlösungen hinreichend gleich ist. Die geringfügigen Schwankungen der Toxizität, die zumal bei längerer Aufbewahrung eintreten können und für die Prüfungstechnik immerhin störend sind, lassen sich durch die Benutzung eines Standardserums ausschalten.

Als Standardserum dient ein durch Immunisierung mit Shiga-Kruse-Kulturen an Pferden gewonnenes und nachher getrocknetes Immunserum, das in Mengen von 0,5 g in Vakuumröhrchen eingeschmolzen aufbewahrt wird und in dieser Form sich lange unverändert wirksam erhält. Der Inhalt eines Röhrchens wird unmittelbar vor der Prüfung in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst. 0,001 ccm dieser Lösung ist imstande, die oben erwähnte Giftmenge zu neutralisieren.

Die Prüfung der eingesandten Ruhrsera erfolgt in Parallelreihen gegenüber den verschiedenen Verdünnungen des Standardserums. 2 Kontrollmäuse erhalten zur gleichen Zeit intravenös die Prüfungsgiftdosis (s. oben) unter Hinzugabe von 0,25 ccm Kochsalzlösung. Die Beobachtungsdauer für die Tiere beträgt 6 Tage. Nach Abschluß dieser Zeit erfolgt die Beurteilung des Serumwertes mit der Maßgabe, daß als „1-faches“ Ruhrserum solche Präparate bezeichnet werden, bei denen unter Vergleich mit dem Standardserum Mengen bis zu 0,001 ccm lebensrettend wirken, als „2-fach“ solche, wo sich noch 0,0005 ccm als wirksam erweist, usw. Sera, bei denen 0,001 ccm unwirksam ist, werden als nicht vollwertig zurückgewiesen.

Nachstehend ist zur Erläuterung des Gesagten ein Prüfungsprotokoll wiedergegeben.

Tabelle 12.

Wertbestimmung des Dysenterieserums x am 10. 9. 1920.

Maus	Serum		Toxin	Befund am 11. 9.	12. 9.	13. 9.	14. 9.	15. 9.	16. 9.
	Die Gemische (0,5 ccm) werden nach halbstündigem Stehen bei Zimmertemperatur intravenös injiziert								
1	Standard-Serum	0,25 ccm d. 125-f. Verd. = 0,002	0,25 ccm d. 3-f. Verd. = 0,0833	0	0	0	0	0	0
2		„ „ 250-f. „ = 0,001	„ „ „	0	0	0	0	0	0
3		„ „ 500-f. „ = 0,0005	„ „ „	0	0	0	0	0	† 6
4		„ „ 1000-f. „ = 0,00025	„ „ „	0	0	0	0	† 5	
5	Dysenterieserum x	„ „ 125-f. „ = 0,002	„ „ „	0	0	0	0	0	0
6		„ „ 250-f. „ = 0,001	„ „ „	0	0	0	0	0	0
7		„ „ 500-f. „ = 0,0005	„ „ „	0	0	0	0	0	0
8		„ „ 1000-f. „ = 0,00025	„ „ „	0	0	0	0	0	† 6
9	Kontrollen	0,25 ccm physische Kochsalzlösg.	„ „ „	kr.	† 2				
10		„ „ „	„ „ „	kr.	† 2				

Das Serum wurde am 17. 9. als „2-fach“ zugelassen.

Für die Unschädlichkeitsprüfung gelten beim Dysenterieserum natürlich die gleichen Gesichtspunkte, die früher (S. 33) dargelegt sind.

Ueber die Nachprüfung älterer Dysenteriesera sind bisher amtliche Bestimmungen noch nicht erlassen.

4. Die Prüfung des Meningokokkenserums.

Bei dem Meningokokkenserum, dessen spezifische Wirkungen bei frühzeitiger und besonders intralumbaler Anwendung heute unbestritten sind, das nach dem Urteil Neufelds sogar nach dem Diphtherieserum als das erfolgreichste aller Heilsera gelten muß, ist die Aufstellung einer einwandfreien Wertbestimmungsmethode mit großen Schwierigkeiten verknüpft.

In der ersten Zeit nach der Herstellung des Serums versuchte man die antiinfektiöse Wirkung im Tierversuch festzustellen und als Maßstab der Wertigkeit heranzuziehen. Ruppel (161) und Jochmann (72) glaubten auf diesem Wege zu brauchbaren Ergebnissen zu kommen, ihre Angaben fanden aber keine Bestätigung. Die Virulenz der Meningokokkenstämme für unsere gewöhnlichen Versuchstiere ist so gering und außerdem so schwankend, daß sich der direkte Heilversuch am Tier mit lebenden Kulturen zu einer exakten Wertprüfung des Serums nicht verwerten läßt. Kolle und Wassermann, Flexner, Neufeld, Kraus und Dörr sowie Boehncke kamen übereinstimmend zur Ablehnung eines solchen Verfahrens.

Größere Aussicht für eine erfolgreiche Titrierung des Meningokokkenserums im Tierversuch schien zunächst die von Kraus und Dörr (91), Wassermann und Leuchs (185) sowie von Kraus und Bächer (89) vorgeschlagene, auch von Flexner (62, 63, 64) und von Dopter (48) bestätigte Möglichkeit der Prüfung der giftneutralisierenden Wirkung zu bieten. Die zu diesen Prüfungen benötigten Giftlösungen werden entweder durch Abschwemmen des 24-stündigen Kulturrasens von Kolle-Schalen, die mit verschiedenen Meningokokkenstämmen besät waren, mit je 5 ccm sterilen destillierten Wassers gewonnen (Wassermann und Leuchs) oder durch Abschwemmen 48-stündiger Kulturen mit 10 ccm $^1/_{10}$-Normalsodalösung (Kraus und Bächer). Nach 48-stündigem Schütteln bei Zimmertemperatur und Zusatz von 0,5 % Phenol wird scharf zentrifugiert. Der klare, schwach gelbliche Abguß wird als Gift verwendet. Man kann entsprechende Toxine auch aus toluolversetzten, durch Berkefeldkerzen filtrierten Kochsalzaufschwemmungen oder filtrierten Bouillonkulturen der Meningokokken herstellen (Flexner). Derartige Gifte sollen in Mengen von 0,1—0,3 ccm bei Meerschweinchen von 150 g innerhalb 24 Stunden tödlich wirken. Bei der Prüfung werden fallende Mengen des Serums mit der mehrfach tödlichen Dosis der stets frisch bereiteten Giftlösung gemischt und nach $^1/_2$-stündiger Bindung den Tieren intraperitoneal injiziert.

Es zeigte sich aber bei Nachprüfungen dieser Angaben, daß die Giftbildung der einzelnen Meningokokkenstämme außerordentlich verschieden ist und daß man nur selten Gifte von solchen Werten gewinnen kann. Abgesehen davon, schwanken aber auch die Extrakte in ihrer Giftwirkung häufig so stark, daß schon bei der Gifteinverleibung allein die Versuchsreihen nicht entsprechend den quantitativen Verhältnissen ausfallen, noch weniger aber bei der Injektion der Gift-Serum-Gemische. Die Toxine sind so labil, daß sie sich schon in wenigen Tagen — besonders bei Karbolzusatz — oft sehr erheblich abschwächen. Die Gewinnung eines einigermaßen konstanten Testtoxins, das für prüfungstechnische Zwecke brauchbar wäre, ist also nicht möglich. Die Prüfung der Toxine an Mäusen und Kaninchen ergab übrigens die gleichen unbefriedigenden Resultate wie bei den Meerschweinchen (Boehncke).

Krumbein und Diehl (96) verwendeten, da sie die Kokkenextrakte für Wertbestimmungsversuche als ungeeignet befanden, an deren Stelle sterilisierte Emulsionen der Meningokokken und behaupteten, daß sich die letzteren bis zu 3 Monaten unverändert toxisch erhielten. Auch diese Modifikation der Prüfung der Giftneutralisation im Tierversuch ist nach Boehnckes (29) Versuchen unbrauchbar. Wir verfügen zurzeit über kein Verfahren, das uns durch den Tierversuch zuverlässige Anhaltspunkte für die Bestimmung des Heilwertes eines Meningokokkenserums

bieten könnte. Die ausschließliche Ermittlung des giftneutralisierenden Wertes würde auch, wie BOEHNCKE betont, günstigsten Falles nur eine bestimmte Quote der Serumwirkung feststellen, die nach Ansicht der meisten Autoren für den Heileffekt nicht einmal von besonderer Bedeutung sein dürfte, denn die toxischen Erscheinungen spielen im Krankheitsbild der Meningokokken-Allgemeininfektion keineswegs eine so wichtige Rolle, wie z. B. beim Tetanus oder bei der Diphtherie.

Von den Reagenzglasmethoden, die für die Prüfung des Meningokokkenserums empfohlen wurden, sei zunächst erwähnt, daß aus dem Ausfall der Agglutinationsreaktion nach fast einstimmigem Urteil keine bindenden Schlüsse auf den Schutz- oder Heilwert des Serums gezogen werden können, weil letzterer dem Agglutinationsvermögen keineswegs parallel geht und zudem die Agglutinabilität der einzelnen Meningokokkenstämme in weiten Grenzen schwankt (vgl. BLUMENTHAL, 26a). Manche Sera zeigen, wenn die Prüfungen nach Jahresfrist wiederholt werden, eine starke Abnahme der Agglutinine, obwohl die komplementbindenden und bakteriotropen Immunkörper annähernd erhalten blieben und demnach nach unseren jetzigen Anschauungen eine wesentliche Abschwächung des Heilwertes nicht anzunehmen ist (BOEHNCKE, 29). Auch die Bewertung der Meningokokkensera nach ihrem Gehalt an bakteriziden Ambozeptoren kommt nicht in Frage, weil nach den Untersuchungen von NEUFELD (127), KRAUS und BÄCHER (89), FLEXNER und JOBLING (65), BOEHNCKE (30) nennenswerte bakteriolytische Wirkungen dem Serum, auch in Verwendung mit Komplement oder frischem Peritonealexsudat von Meerschweinchen, nicht innewohnen.

Die Frage, inwieweit über den Heilwert des Meningokokkenserums die von KOLLE und WASSERMANN (86, 87) empfohlene Bestimmung der komplementbindenden Antikörper gegenüber einem spezifischen Antigen brauchbare Aufschlüsse gibt, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Aus den Arbeiten von NEUFELD (127), KRAUS und DÖRR (91), BÄCHER und HACHLA (6), WASSERMANN und LEUCHS (185), FLEXNER und JOBLING (65), JOCHMANN (72), ONAKA (138), COLOMBO (40), BOEHNCKE (29, 30), BLUMENTHAL (26a) u. a. geht hervor, daß die Komplementbindungsmethode jedenfalls bei Vergleichsprüfungen für die Praxis hinreichend gleichmäßige Resultate ergibt und grundsätzlich bei einer amtlichen Prüfung verwertbar ist.

Die früher vielfach vertretene Anschauung, daß die BORDETschen komplementbindenden Antikörper mit den bakteriziden Ambozeptoren identisch seien, ist später als irrig erkannt worden. Diese Stoffe können ebensowenig wie die Agglutinine als Heilstoffe angesehen werden, aber ihre Menge steigt, wie ONAKA (138) und BOEHNCKE (29) übereinstimmend feststellten, im Immunserum im Verlaufe der Immunisierung der Serumtiere ständig an, und ihre Spezifität läßt sich gerade im Meningokokkenserum besonders deutlich nachweisen. Es besteht also

zum mindesten die Wahrscheinlichkeit, daß von den noch unbekannten, therapeutisch wirksamen Stoffen doch die einen oder anderen durch die Titrierung der komplementbindenden Antikörper mitbestimmt werden.

Die Prüfung mit Hilfe des Komplementbindungsverfahrens ist jetzt neben der später zu besprechenden Bestimmung der Bakteriotropie für die amtliche Wertbemessung des Meningokokkenserums vorgeschrieben.

Die Prüfung muß im Vergleich zu einem Standardserum erfolgen. Bei der Konservierung der Sera, die zu Standardzwecken Verwendung finden sollen, ist zu beachten, daß in flüssigen, mit Karbol versetzten Seren der Gehalt an komplementbindenden Stoffen unter Umständen bald erheblich zurückgeht (KRUMBEIN und SCHATILOFF, 97; BOEHNCKE, 29). Die beste Konservierung gewährleistet auch hier, wie bei den früher besprochenen Standardserumpräparaten, die EHRLICHsche Vakuummethode (vgl. S. 45), die den Anfangstiter des Serums lange Zeit unvermindert erhält.

Das für den Komplementbindungsversuch benötigte spezifische Antigen läßt sich in verschiedener Form gewinnen. KOLLE und WASSERMANN (86, 87) benutzten Schüttelextrakte aus Meningokokkenkulturen, später empfahlen KOLLE und seine Mitarbeiter KRUMBEIN, SCHATILOFF und DIEHL jedesmal frisch hergestellte Meningokokkenaufschwemmungen. Für die staatliche Prüfung, bei der es auf einen lange Zeit unveränderlichen Gehalt des Antigens an spezifischen Substanzen ankommt, sind Kokkenemulsionen unbrauchbar, weil bei ihrer Aufbewahrung die autolytischen Vorgänge eine ständig fortschreitende Abschwächung zur Folge haben. Bei der Verwendung von Extrakten hat man mit späteren erheblichen Abschwächungen nicht in dem Maße zu rechnen. Die von WASSERMANN und LEUCHS (185) hergestellten karbolisierten Schüttelextrakte schwächten sich nur in den ersten Wochen ab, hielten sich dann aber nach einer Ablagerung von mehreren Monaten lange Zeit unverändert wirksam.

BOEHNCKE (29) empfiehlt für die Herstellung eines polyvalenten Meningokokkenextraktes in Anlehnung an die früher von WASSERMANN und LEUCHS gegebene Vorschrift folgendes Verfahren: Mehrere KOLLEsche Agarflaschen werden mit je einem Meningokokkenstamm (verschiedene Laboratoriumskulturen und frisch aus dem Körper gezüchtete Stämme möglichst gemischt) beimpft und nach 36—40-stündigem Verweilen im Brutschrank bei 37° mit je 10—15 ccm 37° warmen, sterilen, destillierten Wassers, entsprechend der Stärke des Bakterienrasens, abgeschwemmt. Die Mischung dieser Aufschwemmungen wird 30 Stunden im Schüttelapparat bei Zimmertemperatur geschüttelt, dann bis zu völliger Klarheit zentrifugiert und nach probeweiser Einstellung unter einer Toluolschicht in dunkler Flasche mit Paraffin-Gummiverschluß mindestens 3 Monate im Eisschrank aufbewahrt. Nach dieser Ablagerung wird der Extrakt genau eingestellt und in kleinen Quantitäten in dicht über der

Flüssigkeitskuppe abgeschmolzenen Glasröhrchen auf Eis oder besser noch eingefroren konserviert.

Gegenwärtig werden im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. bei der staatlichen Prüfung der Meningokokkensera polyvalente Antiforminextrakte aus Meningokokkenkulturen verwendet. Sie werden aus den in der oben geschilderten Weise gewonnenen Abschwemmungen von den KOLLEschen Schalen derart hergestellt, daß je 500 ccm der Abschwemmung mit 15 ccm Antiformin und 40 ccm Aqua destillata gemischt werden. Diese Mischung wird dann im Wasserbade $^3/_4$ Stunden lang auf 40° C erhitzt, mit 5-proz. Schwefelsäure und 5-proz. Natriumsulfit (zur Entfernung des überschüssigen Chlors) neutralisiert und mit Toluol überschichtet. Wenn der Extrakt stark getrübt ist, wird er zentrifugiert, von dem Bodensatz in eine neue Flasche abgegossen und erneut mit Toluol überschichtet. Auch dieser Extrakt hält sich, wenn er abgelagert ist, mehrere Jahre unverändert wirksam. Er wird in dunklen Flaschen im Eisschrank aufbewahrt.

Ueber die Technik des Komplementbindungsversuches bei der Prüfung der Meningokokkensera ist Folgendes zu sagen:

Vor jeder Prüfung wird zunächst der Ambozeptor (Hammelblutkaninchenserum) in der Weise eingestellt, wie es das in Tabelle 13 wiedergegebene Versuchsprotokoll zeigt. Nach dem Ergebnis dieses Versuchs wird beim Hauptversuch als Gebrauchsdosis diejenige Ambozeptorlösung verwendet, die $2^1/_2$—3-fach konzentrierter ist, als die stärkste hier nach 20 Minuten noch komplett lösende Verdünnung.

Da im Hauptversuch stets 0,5 ccm Ambozeptorlösung zur Verwendung kommt, muß der im Vorversuch ermittelte Grenzwert nötigenfalls auf diese Flüssigkeitsmenge umgerechnet werden. In unserem Versuchsprotokoll löste nach 20 Minuten noch 0,5 ccm der 1000-fachen Verdünnung. Es war demgemäß im Hauptversuch 0,5 ccm einer 350-fachen Verdünnung anzuwenden.

Tabelle 13.

Ambozeptor-Einstellung.

Röhrchen	Ambozeptor	Kochsalzlösung ccm	Meerschw.-Ser., 4-f. verdünnt, ccm	Hammelblutkörp.-Aufschwemmung ccm	Versuchsergebnis nach 20 Min.	Versuchsergebnis nach 1 Std.
1	1,0 ccm 1000-f. Verdünnung	0,2	0,2	0,5	kompl.	kompl.
2	0,5 „ „ „	0,7	„	„	„	„
3	0,25 „ „ „	0,95	„	„	mäßig	„
4	1,0 „ 8000-f. „	0,2	„	„	wenig	„
5	0,5 „ „ „	0,7	„	„	0	mäßig
6	0,25 „ „ „	0,95	„	„	0	wenig
7	0,1 „ „ „	1,1	„	„	0	Spur
8 (Kontr.)	—	1,2	„	„	0	0

Tabelle 14.

Prüfung des Meningokokkenserums x im Komplementbindungsversuch.

Röhrchen	Serum	Kochsalzlösung ccm	Extrakt ccm	Komplement (Meerschw.-Ser., 4-f. verdünnt) ccm		Versuchs-Ergebnis (Hämolyse) bei Standardser.	Versuchs-Ergebnis (Hämolyse) bei Mening. Serum x
1	0,1 = 0,5 ccm 5-f. Verd.	—	0,2	0,2	Nach 1-stünd. Verweilen im 37° Brütschrank Zusatz d. hämolyt. Systems: 0,5 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung + 0,5 ccm Ambozeptor-Gebrauchslös. Beurteilg. d. Versuchsergeb. n. Lös. sämtl. Kontr.	0	0
2	0,04 = 0,2 „ „ „	0,3	„	„		0	0
3	0,02 = 0,1 „ „ „	0,4	„	„		0	0
4	0,01 = 0,5 „ 50-f. „	—	„	„		0	0
5	0,005 = 0,25 „ „ „	0,25	„	„		wenig kompl.	mäßig kompl.
6	0,0025 = 0,5 „ 200-f. „	—	„	„		„	„
7	0,00125 = 0,25 „ „ „	0,25	„	„		„	„
8	0,000625 = 0,125 „ „ „	0,375	„	„		„	„
9	—	0,3	0,4	„		„	„
10	—	0,5	0,2	„		„	„
11	0,1 = 0,5 ccm 5-f. Verd.	0,2	—	„		„	„
12	0,04 = 0,2 „ „ „	0,5	—	„		„	„
13	0,02 = 0,1 „ „ „	0,6	—	„		„	„
14	0,01 = 0,5 „ 50-f. „	0,2	—	„		„	„
15	0,005 = 0,25 „ „ „	0,45	—	„		„	„
16	0,0025 = 0,5 „ 200-f. „	0,2	—	„		„	„
17	0,00125 = 0,25 „ „ „	0,45	—	„		„	„
18	0,000625 = 0,125 „ „ „	0,575	—	„		„	„
19	—	0,7	—	„		„	„

Es werden dann gleiche, fallende Mengen (0,1 bis 0,000625 ccm) einerseits des Standardserums und andererseits des zu prüfenden Serums mit 0,2 ccm Extrakt und 0,2 ccm Komplement (4-fach verdünntem Meerschweinchenserum) gemischt und mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt, bis der Inhalt jeden Röhrchens 0,9 ccm beträgt.

Als Kontrollen werden angesetzt die doppelte und die einfache Extraktdosis ohne Serum (Röhrchen 9 und 10), ferner die gleichen fallenden Serummengen ohne Extrakt (Röhrchen 11—18) und die Komplementdosis allein (Röhrchen 19).

Nach 1-stündigem Verweilen im 37° Brütschrank wird jedem Röhrchen 1,0 ccm des hämolytischen Systems [= 0,5 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung + 0,5 ccm der errechneten Ambozeptorlösung (s. oben)] zugefügt und gut durchgeschüttelt.

Das Ergebnis des Gesamtversuches wird abgelesen, sobald in den Kontrollröhrchen (Röhrchen 9—19) völlige Hämolyse eingetreten ist. Wenn die Meningokokkensera Eigenhemmung zeigen, so läßt sich diese leicht durch kurzes Erwärmen auf 55° C ausschalten.

Die amtliche Prüfungsvorschrift verlangt, daß der Komplementbindungsversuch mindestens einen Titer des Serums von 1 : 100 ergeben soll.

Da, wie bereits erwähnt, die Komplementbindungsreaktion allein sichere Schlüsse auf den Wert eines Meningokokkenserums nicht zuläßt, muß sie bei der staatlichen Prüfung durch ein weiteres Verfahren er-

gänzt werden. Als solches kommt die Bestimmung des Gehaltes an bakteriotropen Substanzen in Frage.

Schon JOCHMANN (72) hat den Nachweis geliefert, daß im Meningokokkenserum neben antitoxischen Stoffen und bakteriziden Ambozeptoren auch phagozytosebefördernde Substanzen enthalten sind. NEUFELD (127, 128) hat dann unter Anlehnung an eine von DENYS und LECLEF (43) für das Streptokokkenserum angegebene und von MEUNES (119) auch beim Pneumokokkenserum mit Erfolg angewandte Methode ein Verfahren zur Austitrierung der bakteriotropen Stoffe des Meningokokkenserums im Reagenzglas ausgearbeitet. Seine Methode gestaltet sich so, daß abgestufte Immunserummengen, in vitro mit Meningokokken und Leukozyten gemischt, eine gewisse Zeit bei 37° gehalten werden und in dem alsdann angefertigten, gefärbten Ausstrichpräparat unter dem Mikroskop die unterste Serumverdünnung festgestellt wird, bei welcher — gegenüber Kontrollen ohne Immunserumzusatz — eine spezifische Anregung der Phagozytose deutlich erkennbar ist. JOCHMANN (72) hat auf diese NEUFELDsche Methode als sehr beachtenswert hingewiesen. FLEXNER und JOBLING (65) benutzten die Wertbestimmung des Meningokokkenserums nach dem Tropingehalt ausschließlich und angeblich mit sicherem Erfolg. Auch KRAUS und BÄCHER (89), desgleichen BÄCHER und HACHLA (6) haben bei ihren Nachprüfungen die Methode brauchbar befunden und sie als Prüfungsverfahren für das Meningokokkenserum — eventuell neben dem Nachweis der giftneutralisierenden Substanzen des Serums — empfohlen. Endlich haben auch BLUMENTHAL (26a) und ONAKA (138) der Verwendung der Tropinmethode als Hilfsverfahren zur Wertbemessung des Meningokokkenserums zugestimmt.

Die im folgenden geschilderte Technik der Bakteriotropinbestimmung schließt sich eng an die von NEUFELD (127, 128) ausgearbeitete Methodik an unter Berücksichtigung einiger von BOEHNCKE (29, 30) angegebener Abänderungen, die nach mehrjähriger Erfahrung die Resultate des bakteriotropen Reagenzglasversuches noch gleichmäßiger gestalten.

Die zu den Versuchen benötigten Leukozyten werden von mittelgroßen Meerschweinchen (von 300—350 g Gewicht) gewonnen, denen man eine kurz vor der Verwendung über der Flamme einmal aufgekochte und dann auf Körpertemperatur abgekühlte Mischung von 10 ccm Bouillon und etwa 0,5 g Aleuronat intraperitoneal injiziert. Für die gleichzeitige Prüfung von 5—6 Seren gebraucht man 2—3 Meerschweinchen. Die Tiere werden 20—24 Stunden nach der Injektion in vorsichtiger Weise (um Blutungen zu verhüten) durch Nackenschlag oder Chloroform getötet. Man eröffnet dann die Peritonealhöhle und wäscht sie mehrfach mit 4—8 (i. g. etwa 50) ccm $^1/_{10}$ % Natrium citricum enthaltender, körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung aus, indem man durch Reiben und Umrühren mit der

Pipette das an den Darmschlingen und am Netz haftende, oft zähe Exsudat abspült. Die gesammelte Waschflüssigkeit wird nach Entfernung etwaiger gröberer Aleuronatpartikel und Fibrinflocken in Zentrifugengläser abgegossen. Nun wird vorsichtig mit geringer Umdrehungszahl 3—4 Minuten lang zentrifugiert, abgegossen, die dem Glase anhaftende Flüssigkeit mit Fließpapier abgesogen, der Bodensatz in frischer Kochsalzlösung aufgewirbelt, nochmals zentrifugiert und abgegossen.

Durch zu langes und zu starkes Zentrifugieren können die Leukozyten völlig unbrauchbar werden. Wenn eine zu starke Kompression der Zellen vermieden werden soll, darf die überstehende Flüssigkeit noch nicht ganz klar sein. Von der geeigneten Beschaffenheit der Leukozyten überzeugt man sich durch ein ungefärbtes Präparat: man sieht zwar keine Bewegungen an den Zellen, doch soll ihre Mehrzahl ganz feine, filiforme Ausläufer, manche auch plumpe Pseudopodien zeigen.

Von den restierenden Leukozyten wird in 37° warmer Kochsalzlösung eine Aufschwemmung hergestellt, die in ihrer Konsistenz einer $^1/_3$-proz. Lecithinemulsion entspricht (MEYER). Letztere kann man sich, mit 0,5 % Phenol versetzt, einige Zeit zum Vergleich vorrätig halten.

Die Bakterienaufschwemmung stellt man her, indem man auf gewöhnlichem (eventuell mit Chapoteau-Pepton hergestellten) Agar gut gewachsene Schrägagarkulturen je mit einer Mischung von 0,5 ccm Bouillon und 0,5 ccm Kochsalzlösung abschwemmt und sorgfältig — unter Vermeidung sichtbarer Klümpchen — emulsioniert. Sie soll so dicht sein, daß sie in ihrem Aussehen einer Bouillon gleicht, in der auf 3 ccm 0,2 g Aleuronat aufgeschüttelt ist.

Kulturen von ungeeignetem Agar ergeben Kokken, die nach $1^1/_2$—2-stündigem Stehen in den Reagenzgläschen schon an den freigelegenen, besonders aber an den von Phagozyten aufgenommenen Exemplaren so stark Degeneration, Verlust der Färbbarkeit und Verklumpung zeigen, daß die Deutlichkeit der Präparate darunter erheblich leidet. Auf gutem Agar gewachsene Meningokokken müssen nach Ablauf der angegebenen Zeit in ihrer Mehrzahl, sowohl intrazellulär wie extrazellulär (soweit nicht Agglutination eingetreten ist), einzeln liegen und distinkt, wenn auch zum Teil nur schwach, gefärbt sein. Auf dieses Verhalten ist besonders zu achten und nötigenfalls ein anderer Stamm oder ein anderer Nährboden zu versuchen. Meningokokkenstämme, bei denen eine Neigung zur Spontanphagozytose durch normale Sera entweder schon primär besteht oder bei weiterer Fortzüchtung sich einstellt, sind auszuschalten.

Für die Versuchstechnik ist es von besonderer Wichtigkeit, das optimale Verhältnis zwischen Bakterien- und Leukozytenmenge zu treffen. Durch Zusatz allzuvieler Bakterien kann die Phagozytose schließlich behindert werden. Eventuell werden, je nach dem Wachs-

tum der Kulturen, kleine Abweichungen von dem angegebenen Mengenverhältnis zweckmäßig sein (NEUFELD).

Nun wird in kleine (15 cm hohe, 6 mm weite), auf niedrigen Gestellen aufgestellte Reagenzröhrchen je 0,1 ccm abgestufter Serumverdünnungen (10-, 25-, 50-, 100-, 200-, 400-, 800- und 1600-fach), ferner in ein Kontrollröhrchen 0,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung, in ein zweites Kontrollröhrchen 0,1 ccm 10-facher Normalserumverdünnung eingefüllt. Dem Inhalt jedes Röhrchens wird — aus ein und derselben Tropfpipette für alle gleichzeitig angesetzten Tropinversuche — 1 Tropfen der Bakterienaufschwemmung zugesetzt. Nach $^3/_4$-stündigem Sensibilisieren der Bakterien fügt man jedem Röhrchen 2 Tropfen der Leukozytenaufschwemmung zu, schüttelt gut durch und setzt die Gestelle für weitere $^3/_4$ Stunden in den 37°-Brütschrank. In der ersten Viertelstunde wird das Reagenzglasgestell zweckmäßig noch 2—3mal kurz durchgeschüttelt. Nach Ablauf der $^3/_4$ Stunden haben sich die Leukozyten als fester Niederschlag am Boden der Gläschen abgesetzt. Man gießt dann die überstehende Flüssigkeit in ein mit Sublimatlösung gefülltes Gefäß ab, stellt die Gläschen umgekehrt auf das zuvor mit einer dicken Fließpapierschicht bedeckte Reagenzglasgestell zurück und fertigt schließlich vom Bodensatz der Röhrchen, den man mit der Platinöse entnimmt und gleichmäßig, ohne stärkeren Druck auszuüben, verteilt, je 2 Ausstrichpräparate an. Letztere werden mit Alkohol-Aether $\overline{aa}$ fixiert und mit verdünnter MANSONscher Methylenblaulösung gefärbt. Das Versuchsresultat ergibt sich aus den bei sorgfältiger Durchmusterung der Präparate festgestellten graduellen Abstufungen der Phagozytose, wie dies das in Tabelle 15 wiedergegebene Protokoll zeigt.

Tabelle 15.

Prüfung des Meningokokkenserums x im Phagozytoseversuch.

Röhrchen Nr.	Serummenge	Phagozytose bei: Standardserum	Phagozytose bei: Serum x
1	0,01 ccm = 0,1 ccm 10-fach. Verd.	+++	+++
2	0,004 „ = 0,1 „ 25-fach. „	+++	+++
3	0,002 „ = 0,1 „ 50-fach. „	++	++
4	0,001 „ = 0,1 „ 100 fach. „	++	+
5	0,0005 „ = 0,1 „ 200-fach. „	±	±
6	0,00025 „ = 0,1 „ 400-fach. „	±	∓
7	0,000125 „ = 0,1 „ 800-fach. „	0	0
8	0,0000626 „ = 0,1 „ 1600-fach. „	0	0
9 Kontrollen	Normalserum: 0,1 ccm 10-fach. Verd.	0	0
10 Kontrollen	Kochsalzlösung 0,1 ccm	0	0

Gebräuchlich sind folgende Bezeichnungen:

+++ = sehr starke Phagozytose: die Leukozyten meist prall mit Kokken gefüllt, nur ausnahmsweise freiliegende Kokken;

++ = starke Phagozytose: in den Leukozyten meist zahlreiche aber nicht mehr so gedrängt liegende Kokken; außerhalb Kokken in spärlicher Zahl;

+ = deutliche Phagozytose: die Leukozyten beherbergen in der großen Mehrzahl noch mehrere Kokken; daneben schon zahlreiche Kokken außerhalb;

± = in der Mehrzahl der Leukozyten noch vereinzelte Kokken, die größere Zahl der letzteren liegt außerhalb;

∓ = in der Minderzahl der Leukozyten noch vereinzelte Kokken, bei weitem die große Mehrzahl der Kokken liegt außerhalb der Freßzellen;

0 = keine Phagozytose.

Der Gehalt der Meningokokkensera an Bakteriotropinen geht, wie die jetzt 5-jährigen Erfahrungen bei der staatlichen Wertbemessung gezeigt haben, dem Komplementbindungstiter im allgemeinen ziemlich parallel. Allerdings kommt die Bestimmung der Bakteriotropine in ihrer jetzigen Methodik den übrigen, bei der staatlichen Wertbemessung, der Sera angewendeten Prüfungsverfahren an Sicherheit und Regelmäßigkeit ihrer Ergebnisse nicht gleich (vgl. S. 58).

Die amtliche Prüfungsvorschrift vom 13. November 1915 betont, daß die in ihr angeordneten Untersuchungsmethoden prüfungstechnisch als vorläufige zu betrachten sind und späterhin unter Zugrundelegung der inzwischen gesammelten Erfahrungen einer Ueberprüfung unterzogen werden sollen. Sie setzt als Mindestanforderung an ein zum Verkehr zuzulassendes Meningokokkenserum einen Komplementbindungstiter von 1:100 und einen bakteriotropen Titer von 1:1000 fest. Ob das zu prüfende Serum diesen Anforderungen entspricht, wird, wie schon erwähnt, durch Vergleich mit dem zu diesem Titer angenommenen Standardserum der staatlichen Prüfungsstelle ermittelt. Erreicht einer der beiden Titer nicht den Mindestwert, so wird ohne Rücksicht auf die Höhe des anderen Titers das Serum zurückgewiesen. Ein Meningokokkenserum, das die beiden Mindesttiter aufweist, heißt ein „einfaches oder Normalheilserum". Als 2-faches, 4-faches usw. Serum wird ein Meningokokkenserum mit dem 2-, 4- usw. fachen Wertgehalt des Standardserums bezeichnet.

Ueber die Unschädlichkeitsprüfung und die Bestimmung des Eiweißgehaltes gelten die schon mehrfach erwähnten allgemeinen Bestimmungen (siehe S. 33).

Eine Nachprüfung der Meningokokkensera findet bis auf weiteres nach Ablauf eines Jahres seit der letzten Prüfung statt. Ein Rückgang der Titer bis zu 25 % bleibt dabei unbeanstandet. Sera, deren erste Prüfung 3 Jahre zurückliegt, unterliegen der Einziehung.

5. Die Prüfung des Antistreptokokkenserums.

Die Chemische Fabrik auf Aktien (vorm. E. Schering) in Berlin stellt nach den Angaben von ARONSON (1) ein Antistreptokokkenserum her, das der staatlichen Prüfung unterstellt ist. Als Maßstab bei

der Wertbemessung dieses Serums dient ein Standardserum mit dem konventionell angenommenen Titer von 20 Aronsonschen IE. (Als Normalserum bezeichnet Aronson ein Serum, von dem 0,01 ccm eine Maus gegen die 10-fach tödliche Minimaldosis hochvirulenter Streptokokkenbouillonkultur schützt. 1 Kubikzentimeter dieses Serums enthält 1 IE.)

Zur Herstellung dieses Antistreptokokkenserums werden zwei verschiedene Arten von Streptokokken benutzt, einmal solche von höchster, durch Tierpassagen gesteigerter Virulenz, und zweitens solche, welche direkt vom Menschen gezüchtet sind und nicht tierpathogen zu sein brauchen. Infolgedessen enthält auch das resultierende Serum zwei verschiedene Quoten wirksamer Substanzen, die den beiden Arten der angewandten Streptokokkenstämme entsprechen. Von diesen läßt sich natürlich bei der Prüfung nur die erste, im Tierversuch wirksame Quote messen, während die Gleichmäßigkeit der zweiten nur durch die von der Fabrik benutzte Darstellungsmethode garantiert wird.

Die Wertbemessung des Serums geschieht nach den Vorschlägen von Aronson in folgender Weise:

Es werden 2 Versuchsreihen angesetzt. In beiden Reihen erhalten je 7 weiße Mäuse subkutan steigende Dosen (je 1 ccm 6000-, 5000-, 4000-, 3000-, 2000-, 1000- und 500-facher Verdünnung) Standardserum und je 7 weitere Mäuse entsprechend gleiche Mengen von dem zu prüfenden Antistreptokokkenserum. 24 Stunden nach der Seruminjektion werden die 14 Mäuse der I. Reihe und 2 Kontrollmäuse mit $^1/_{100\,000}$ (= 0,5 ccm 50000-facher Verdünnung), die 14 Mäuse der II. Reihe und ebenfalls 2 Kontrollmäuse mit $^1/_{10\,000}$ ccm (= 0,5 ccm 5000-facher Verdünnung) einer 24-stündigen virulenten Streptokokkenbouillonkultur intraperitoneal infiziert. Die Virulenz der Kultur soll so hoch sein, daß alle Kontrollmäuse innerhalb 48 Stunden zugrunde gehen. Die Tiere sind nach der Kulturinjektion 4 Tage lang zu beobachten.

Die Ausführung von zwei Doppelreihen ist einmal nötig, weil sich gezeigt hat, daß die Streptokokkensera bei Anwendung verschieden starker Infektionen oft ungleichmäßig wirken und daher eine genaue Wertbemessung meist nur bei einer bestimmten Infektionsdosis möglich ist, und andererseits, weil die Kulturen häufig starke Virulenzschwankungen aufweisen.

Wie die langjährige praktische Erfahrung gezeigt hat, läßt sich nach diesem Verfahren in der Tat die Wertbemessung eines Antistreptokokkenserums mit hinreichender Genauigkeit durchführen. Die zur Prüfung eingesandten Antistreptokokkensera dürfen dem Standardserum in ihrer Wirkung nicht nachstehen, müssen also ebenfalls mindestens 20-fach sein. Das in Tabelle 16 nachstehend wiedergegebene Protokoll zeigt den Verlauf einer solchen Prüfung.

Tabelle 16.

Wertbemessung des Antistreptokokkenserums x.

Am 5. 7. 1 ccm Serumverdünnung:	Verhalten der Tiere am	Reihe I infiziert am 6. 7 mit $^1/_{100\,000}$ ccm Kultur		Reihe II infiziert am 6. 7. mit $^1/_{10\,000}$ ccm Kultur	
		Standardserum	Serum x	Standardserum	Serum x
$^1/_{6000}$	7. 7. 8. 7. 9. 7.	Maus 1 krank † 2.	Maus 8 ? krank † 3.	Maus 15 krank † 2.	Maus 22 krank † 2.
$^1/_{5000}$	7. 7. 8. 7. 9. 7. 10. 7.	Maus 2 ? krank † 3.	Maus 9 0 0 0 0	Maus 16 krank † 2.	Maus 23 krank † 2.
$^1/_{4000}$	7. 7. 8. 7. 9. 7. 10. 7.	Maus 3 0 0 0 0	Maus 10 0 0 0 0	Maus 17 0 krank † 3.	Maus 24 0 krank † 3.
$^1/_{3000}$	7. 7. 8. 7. 9. 7. 10. 7.	Maus 4 0 0 0 0	Maus 11 0 0 0 0	Maus 18 0 ? krank † 4.	Maus 25 0 0 0 0
$^1/_{2000}$	7. 7. 8. 7. 9. 7. 10. 7.	Maus 5 0 0 0 0	Maus 12 0 0 0 0	Maus 19 0 0 0 0	Maus 26 0 0 0 0
$^1/_{1000}$	7. 7. 8. 7. 9. 7. 10. 7.	Maus 6 0 0 0 0	Maus 13 0 0 0 0	Maus 20 0 0 0 0	Maus 27 0 0 0 0
$^1/_{500}$	7. 7. 8. 7. 9. 7. 10. 7.	Maus 7 0 0 0 0	Maus 14 0 0 0 0	Maus 21 0 0 0 0	Maus 28 0 0 0 0
Kontrollen	7. 7. 8. 7.	Maus 29 krank † 2.	Maus 30 krank † 2.	Maus 31 krank † 2.	Maus 32 krank † 2.

Das Serum wurde am 11. 7. als vollwertig zugelassen.

6. Die Prüfung des Rotlaufserums.

Die erste Wertbemessungsmethode für Rotlaufserum stammt von Lorenz (104). Er spritzte grauen Mäusen in eine Hauttasche 0,01 ccm einer Rotlaufbouillonkultur und injizierte gleich nach der Impfung fallende Dosen des zu prüfenden Serums subkutan. Das Serum mußte so mindestens in der Dosis von 0,01 ccm die Mäuse vor dem Tode schützen. Voges und Schütz (179) bestimmten den Schutzwert an

Mäusen in der Weise, daß sie Serum und Kultur (0,1 ccm = etwa 110-fache tödliche Dosis) gemischt gleichzeitig subkutan injizierten.

Bei diesen Verfahren verlaufen aber die Versuchsreihen, wie eine längere Erfahrung ergab, oft unregelmäßig. Als Ursache derartiger Differenzen ist nach den Untersuchungen von Marx (113) die mangelhafte und langsame Komplettierung des Rotlaufserums durch den Organismus der Mäuse anzusehen. Es können unter Umständen mehrere Stunden vergehen, bis das mit der Kultur gemischt injizierte Serum aktiviert wird, und in dieser Zeit haben anscheinend die Bakterien inzwischen Gelegenheit, sich im Körper der Maus zu vermehren. Das später aktivierte Serum findet dann, den individuellen Verhältnissen entsprechend, durchaus verschiedene Mengen Kultur vor, wodurch die störenden Unregelmäßigkeiten entstehen. Marx änderte daher, nachdem er zunächst vergeblich versucht hatte, das inaktive Rotlaufserum durch natives, komplementhaltiges Serum zu aktivieren, die alte Prüfungsmethode in der Weise ab, daß er zuerst das Serum allein subkutan gab und dann, 24 Stunden später, die Infektion intraperitoneal vornahm, damit die Bakterien in einer Weise dem Tiere zugeführt werden, daß sie der Wirkung des Immunkörpers sofort unterliegen und eine Wucherung ausgeschlossen wird.

Diese Methode ergibt, wie auch Nachprüfungen von anderer Seite, z. B. von Casper, bestätigt haben, praktisch sehr gute Resultate. Sie wird auch heute noch angewendet und ist für die Wertbestimmung auch anderer Sera vorbildlich geworden. Nur werden jetzt als Prüfungstiere statt der grauen in der Regel weiße Mäuse benutzt. Diese bieten den Vorteil, daß man bei ihnen, wie schon Marx feststellte, die Infektion bereits nach einer Stunde vornehmen kann, da sie scheinbar das Immunserum schneller als graue Mäuse aktivieren, und daß sie viel leichter zu beschaffen sind als letztere.

Das Verfahren der Rotlaufserumprüfung, wie es jetzt geübt wird, bezweckt einerseits die Feststellung der Unschädlichkeit und andererseits die Wertbestimmung. Das Serum soll klar und frei von gröberen Niederschlägen sein. Die mit Hilfe der gebräuchlichen bakteriologischen Methoden vorgenommene Prüfung auf Keimgehalt darf nicht mehr als 100 Keime im Kubikzentimeter ergeben (vgl. S. 33). Die Menge des dem Serum zugesetzten Phenols soll 0,5 % nicht übersteigen.

Die Wertbestimmung muß bei jedem für den Verkehr bestimmten Rotlaufserum einen Mindestgehalt von 100 IE. im Kubikzentimeter ergeben. Das Serum ist als diesen Anforderungen genügend anzusehen, wenn es in seiner Schutzwirkung nicht hinter der des als 100-fach angenommenen Standardserums zurückbleibt.

Als Standardserum dient ein im Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. genau eingestelltes Rotlaufserum, das

ebenso wie die anderen Standardsera in bestimmten Mengen in Vakuumröhrchen (vgl. S. 45) eingeschmolzen ist. Wenn der Inhalt eines solchen Standardserumröhrchens in der jeweils vorgeschriebenen Menge — zurzeit 5 ccm — Kochsalzlösung aufgelöst wird, erhält man eine Lösung, die einem 10-fach verdünnten Serum entspricht und in jedem Kubikzentimeter 10 IE. enthält. Diese Lösung ist zu jeder Prüfung frisch herzustellen.

Die zur Infektion der Mäuse benötigte Rotlaufkultur muß mindestens so virulent sein, daß die intraperitoneale Einspritzung von $^1/_{1000}$ bis $^1/_{30\,000}$ ccm 24-stündiger Bouillonkultur die Tiere spätestens nach 5—7 Tagen tötet.

Es werden 2 Prüfungsreihen zu je 12 weißen Mäusen angesetzt. Jede Maus kommt in ein besonderes Glas, das die im Versuchsprotokoll (S. 104) aufgenommene Bezeichnung trägt. Die Mäuse der ersten Reihe erhalten subkutan steigende Mengen Standardserum, die der zweiten Reihe entsprechende Dosen des zu prüfenden Rotlaufserums, d. h. Mengen, die nach der Wertangabe der Fabrik die gleiche Zahl Immunitätseinheiten enthalten müßten, wie die gewählten Standardserum-Verdünnungen.

Man spritzt also von jedem der beiden Sera je 2 Mäusen ein:

0,5 ccm d. Mischung	1 ccm 50-f. Ser.-Verdünng. + 1 ccm Kochsalzlsg.	= 0,005	Serum
0,5 „ „	1,6 „ „ „ + 0,4 „ „	= 0,008	„
0,5 „ der 50-fachen Serum-Verdünnung		= 0,01	„
0,5 „ d. Mischung	0,6 ccm 10-f. Ser.-Verdünng. + 1,4 „ „	= 0,015	„
0,5 „ „	0,8 „ „ „ + 1,2 „ „	= 0,02	„
0,5 „ „	1,2 „ „ „ + 0,8 „ „	= 0,03	„

Eine Stunde nach der Seruminjektion werden alle Mäuse zugleich mit 2 unbehandelten Kontrollmäusen mit 0,3 ccm einer mit physiologischer Kochsalzlösung 30-fach verdünnten Rotlaufbouillonkultur intraperitoneal infiziert. Die Beobachtung der Versuchstiere dauert 8 Tage, der Prüfungsabschluß findet am 9. Tage statt.

Bei regelrechtem Verlauf der Versuchsreihen müssen die Kontrolltiere in 2mal 24, spätestens in 3mal 24 Stunden eingehen. Von den mit Standardserum behandelten Mäusen müssen diejenigen, welche die kleineren Serummengen erhielten, mit einer Verzögerung von einigen Tagen sterben, während die mit den größeren Mengen des Standardserums (meist von 0,01 ccm an) behandelten Mäuse am Leben bleiben müssen. Die eingegangenen Tiere werden seziert, um interkurrente Krankheiten als Todesursache auszuschließen.

Tabelle 17.

Prüfung des Rotlaufserums x am 29. 5.

	Standardserum		Serum x			Standardserum		Serum x	
	Dosis 0,005					Dosis 0,015			
	Maus 1a	Maus 1b	Maus 7a	Maus 7b		Maus 4a	Maus 4b	Maus 10a	Maus 10b
30. 5.	0	0	0	?	30. 5.	0	0	0	0
31. 5.	?	0	?	krank	31. 5.	0	0	0	0
1. 6.	krank	krank	krank	„	1. 6.	0	0	0	0
2. 6.	† 4	„	„	† 4	2. 6.	0	0	0	0
3. 6.	.	† 5	„	.	3. 6.	0	0	0	0
4. 6.	.	.	† 6	.	4. 6.	0	0	0	0
					5. 6.	0	0	0	0
					6. 6.	0	0	0	0
	Dosis 0,008					Dosis 0,02			
	Maus 2a	Maus 2b	Maus 8a	Maus 8b		Maus 5a	Maus 5b	Maus 11a	Maus 11b
30. 5.	0	0	?	0	30. 5.	0	0	0	0
31. 5.	0	?	?	?	31. 5.	0	0	0	0
1. 6.	?	krank	krank	?	1. 6.	0	0	0	0
2. 6.	krank	„	„	krank	2. 6.	0	0	0	0
3. 6.	„	„	„	„	3. 6.	0	0	0	0
4. 6.	„	† 6	† 6	„	4. 6.	0	0	0	0
5. 6.	† 7	.	.	„	5. 6.	0	0	0	0
6. 6.	.	.	.	† 8	6. 6.	0	0	0	0
	Dosis 0,01					Dosis 0,03			
	Maus 3a	Maus 3b	Maus 9a	Maus 9b		Maus 6a	Maus 6b	Maus 12a	Maus 12b
30. 5.	0	0	0	0	30. 5.	0	0	0	0
31. 5.	0	0	0	0	31. 5.	0	0	0	0
1. 6.	0	0	0	0	1. 6.	0	0	0	0
2. 6.	0	0	0	0	2. 6.	0	0	0	0
3. 6.	?	0	0	?	3. 6.	0	0	0	0
4. 6.	?	krank	0	?	4. 6.	0	0	0	0
5. 6.	?	?	0	0	5. 6.	0	0	0	0
6. 6.	0	0	?	0	6. 6.	0	0	0	0

		Maus 13a	Maus 13b
Kontrollen:	30. 5.	?	?
	31. 5.	† 2	krank
	1. 6.	.	† 3

Ist das zur Prüfung gestellte Rotlaufserum ebenfalls 100-fach, so muß die zweite Versuchsreihe der ersten parallel verlaufen. Sterben von dieser Reihe noch Tiere mit höheren Serumdosen als bei der ersten Prüfungsreihe, so ist die Prüfung zu wiederholen. Wenn auch bei der Wiederholung Tiere mit höheren Dosen des zu prüfenden Serums als in der Prüfungsreihe mit dem Standardserum sterben, ist das Serum als nicht vollwertig zu bezeichnen. Das in Tabelle 17 wiedergegebene Prüfungsprotokoll zeigt den Verlauf der Prüfung eines in Uebereinstimmung mit der Angabe der Herstellungsstätte als 100-fach befundenen Rotlaufserums.

7. Die Prüfung des Schweineseucheserums.

Wassermann und Ostertag (186) ließen ein „Schweineseucheserum“ herstellen, das insofern von den anderen Seris abwich, als zur Immunisierung der Tiere möglichst zahlreiche Stämme des Bacillus suisepticus von möglichst verschiedener Provenienz verwendet wurden. Zu diesem Immunisierungsverfahren waren sie auf Grund von Beobachtungen gekommen, bei denen sich gezeigt hatte, daß Schweineseuchesera zwar gegen den homologen Stamm wirksam waren, dagegen nicht gegen andere Stämme derselben Bakterienart schützten. Die Ergebnisse ihrer Versuche wurden später von Bruck (36) bestätigt.

Für das Verhalten der Sera gaben Wassermann und Ostertag folgende Erklärung: Das Bakterienprotoplasma ist nicht als eine biologische Einheit aufzufassen, sondern setzt sich aus einzelnen Komponenten zusammen. Diese Komponenten können in relativ weiten Grenzen schwanken. Alle Schweineseuchebakterien haben zwar gemeinsame dominante Rezeptoren, jedes einzelne besitzt aber Partialrezeptoren, die bei den einzelnen Stämmen erheblich voneinander abweichen. Bei der Immunisierung mit derartigen Bakterien (z. B. Schweineseuche) löst jede Komponente durch Bindung an den betreffenden Rezeptor einen ihr entsprechenden Antikörper (Ambozeptor) aus, so daß also der im Serum auftretende gesamte Immunkörper sich aus einzelnen verschiedenen Immunkörpern (Partialimmunkörpern) zusammensetzt. Dementsprechend resultiert bei der Immunisierung mit nur einem Stamm ein Serum, das neben den allen Schweineseuchebakterien gemeinsamen Ambozeptoren eine bestimmte Anzahl Partialambozeptoren enthält, die nur für die Rezeptoren des Ausgangsstammes passen. Infolgedessen wird ein solches Serum nur gegen die Ausgangsstämme oder zufällig gleich gebaute Stämme wirksam sein können, während es gegenüber einer großen Reihe anderer Stämme wenig oder gar nicht wirksam sein wird.

Um diesem Uebelstande zu begegnen, empfahlen Wassermann und Ostertag die Immunisierung eines Tieres mit verschiedenen Stämmen oder die Mischung der Sera verschiedener Tiere, die mit einzelnen, aber verschiedenartigen Stämmen vorbehandelt waren. So entsteht ein „multipartiales“ Serum, das polyvalent wirkt. Es setzt sich im Gegensatz zu dem nur mit einem Stamme gewonnenen Serum aus einer weit größeren Zahl verschiedener Partialteile zusammen. Letzteres (das monovalente Serum) wirkt, wenn es zufälligerweise einen Stamm trifft, auf den seine Partialambozeptoren passen, bereits in geringeren Mengen als ein multivalentes, dafür gibt es aber zahlreiche Stämme, bei denen es ungenügend wirksam sein muß, da deren individuell schwankende Nebenrezeptoren in ihm ungenügend vertreten sind. Das multipartiale Serum wird dagegen den einzelnen Stamm zwar erst in

etwas höherer Konzentration beeinflussen, dafür hat es aber den Vorteil, sofern es genügend multipartial ist, daß kaum ein Stamm vorkommen wird, bei dem es infolge seines großen Gehaltes an den verschiedenen Nebenrezeptoren keine schützende Wirkung ausübt.

Zu bemerken ist dabei, daß WASSERMANN und OSTERTAG die Bezeichnung „multipartial" gebrauchten, im Gegensatz zu den schon früher von DENYS und VAN DE VELDE (42) beim Streptokokkenserum und von LIGNIÈRES und SPITZ (103) beim Sérum polyvalent contre les Pasteurelloses gewählten Ausdruck „polyvalent". Erstere bezeichneten Sera als „polyvalent", wenn sie mit Bakterien derselben Gruppe, die aus klinisch verschiedenen Krankheitsfällen oder von verschiedenen Tierarten herstammten, gewonnen wurden, letztere gebrauchten diesen Ausdruck für solche Immunsera, die gegen „alle" Pasteurellosen wirksam sein sollen.

Im rein prüfungstechnischen Sinne nennen wir „polyvalent" solche Sera, die im Prüfungsversuch gegen die verschiedensten Stämme derselben Bakterienart schützen. Dabei ist es im Grunde gleichgültig, wie diese Sera gewonnen werden. Für den Fall, daß jemand zur Immunisierung einen besonders geeigneten Stamm wählt, dessen Rezeptorenapparat besonders günstig gebaut ist, kann er unter Umständen auch so ein „polyvalentes" Serum gewinnen. In der Regel werden aber nur „multipartiale" Sera „polyvalent" wirksam sein.

Soll ein Serum prüfungstechnisch als „polyvalent" gelten, so muß es dementsprechend auch gegen verschiedene Stämme geprüft werden. Die Prüfung des WASSERMANN-OSTERTAGschen Serums geschah infolgedessen in der Weise, daß seine Schutzwirkung im Vergleich mit einem Test(Standard)serum gegen ein Gemisch von acht verschiedenen Kulturen geprüft wurde.

Das WASSERMANN-OSTERTAGsche Serum wird heute nicht mehr hergestellt. Dagegen bringen die Farbwerke in Höchst unter dem Namen „Suisepsin" ein monovalentes Serum zur Bekämpfung der Schweineseuche in den Handel, das der staatlichen Prüfung unterstellt ist.

Die Prüfung wird genau in analoger Weise vorgenommen wie beim Rotlaufserum (Protokoll s. Tabelle 17 auf S. 104), d. h. es werden in Doppelreihen je 2 weißen Mäusen einerseits steigende Dosen (0,003, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,02 und 0,03 ccm) des zu prüfenden Serums und andererseits entsprechende Mengen des konventionell als 100-fach angenommenen Standardserums subkutan eingespritzt und alle Tiere nebst 2 Kontrollmäusen 24 Stunden später mit 0,3 ccm der 30-fachen Verdünnung einer genügend virulenten Schweineseuchekultur infiziert. Die Infektion findet hier aber (im Gegensatz zur Prüfung des Rotlaufserums) ebenfalls subkutan statt. Die Beobachtung der Tiere dauert 10 Tage. Die Kontrollmäuse müssen in 2—3 Tagen eingehen. Die zur Prüfung eingesandten Sera dürfen in ihrer Wirkung dem Standardserum nicht nachstehen.

8. Die Prüfung des Geflügelcholeraserums.

Zur Bekämpfung der Geflügelcholera wird von den Höchster Farbwerken ein Serum hergestellt, das unter der Bezeichnung „Galloserin" in den Handel gebracht wird und der staatlichen Prüfung unterliegt.

Als Maßstab der Wertbemessung dient ein Standardserum mit dem konventionell angenommenen Titer von 100 IE. in 1 ccm. Die Prüfung erfolgt auch hier sinngemäß genau ebenso wie beim Schweinerotlaufserum, so daß auf die Darlegungen auf S. 102 und auf das in Tabelle 17 wiedergegebene Prüfungsprotokoll verwiesen werden kann. Der zur intraperitonealen Infektion der Mäuse verwendete Geflügelcholerastamm muß in der Dosis von $^1/_{100}$ ccm Bouillonkultur die Kontrollmäuse innerhalb 24—36 Stunden töten. Bei dem am 10. Tage nach der Infektion erfolgenden Abschluß der Prüfung dürfen sich keine Unterschiede zuungunsten des geprüften Serums ergeben.

9. Die Prüfung des Tuberkulins.

Die staatliche Prüfung des Tuberkulins erfolgt nach einer von DÖNITZ (46) ausgearbeiteten Modifikation des KOCHschen (80) Verfahrens, unter Zugrundelegung des ersten staatlich geprüften Tuberkulins als Standardtuberkulin. Alle Tuberkuline müssen dem ersteren absolut gleichwertig sein. Minderwertige Präparate werden zurückgewiesen, bei stärker wirksamen wird der Fabrik angegeben, in welchem Verhältnis die Verdünnung vorzunehmen ist. Im Interesse der Herstellung möglichst gleichwertiger Tuberkuline wurde früher nur ein Mindestquantum von 100 l zur Prüfung zugelassen. Diese Menge ist später auf 50 l herabgesetzt. Fabrikationsstätten, welche 50 l in einem halben Jahre nicht absetzen, dürfen bei der Einsendung der Probe beantragen, daß die Zulassung in zwei Raten zu je 25 l erfolgen soll. Zwischen der Zulassung der ersten und zweiten Rate darf jedoch höchstens ein Zeitraum von $1^1/_2$ Jahren liegen.

Die ursprüngliche KOCHsche Prüfungsmethode bestand darin, daß an tuberkulös gemachten Meerschweinchen geprüft wurde, ob mindestens 0,5 ccm des zu prüfenden Präparates imstande waren, die Tiere zu töten. KOCH legte dabei keinen besonderen Wert darauf, ob und wie weit die Stärke der einzelnen Präparate dieses Maß überschritt. Speziell veterinär-ärztliche Beobachtungen ließen es später aber erwünscht erscheinen, festere Normen für den Wirkungswert des Tuberkulins zu erhalten.

Umfangreiche, von DÖNITZ ausgeführte Versuche ergaben in Uebereinstimmung mit den früheren Erfahrungen R. KOCHS, daß es nicht

gelingt, die Prüfung an kranken Tieren durch die weniger umständliche an gesunden zu ersetzen. Ein Vorschlag v. Lingelsheims (102), die Prüfung von Tuberkulosegiften an gesunden Meerschweinchen durch intrazerebrale Injektion vorzunehmen, weil bei dieser Art der Einverleibung schon weit kleinere Mengen tödlich wirken, als vom Unterhautzellgewebe aus, ist nach Neufeld (126) nicht annehmbar. Der Wirkungswert des Tuberkulins ist aber, wie Dönitz (46) bewies, mit einer für die Praxis vollkommen ausreichenden Schärfe bestimmbar, wenn die Kochsche Prüfungsweise in bestimmter Weise modifiziert wird.

Die Schwierigkeiten, welche sich bei der Verwendung tuberkulös gemachter Meerschweinchen der Ausarbeitung einer genauen Wertbestimmung des Tuberkulins entgegenstellten, waren folgende: Zunächst zeigte es sich, daß die Prüfung eines und desselben Tuberkulins in verschiedenen Versuchsreihen ganz verschiedene Grenzwerte ergab. Während z. B. in einer Serie schon 0,1 ccm Tuberkulin genügte, um die Tiere innerhalb 24 Stunden zu töten, reichten in einer zweiten Versuchsreihe bei einer anderen Tierserie erst 0,2 oder gar 0,3 ccm hierzu aus. Es zeigte sich also, daß die jedesmal minimal tödliche Dosis ein sehr veränderlicher Wert war. Diese Schwankungen rührten, wie leicht nachzuweisen war, nicht von Schwankungen des Titers des Tuberkulins selbst her, sondern waren abhängig von dem Grade der Tuberkulose der Versuchstiere. Bei genauer Verfolgung der Tuberkulose der geimpften Tiere zeigte sich nämlich, daß die Krankheit in den einzelnen Serien ganz erhebliche Differenzen in ihrem Verlauf aufwies, die hauptsächlich von der Virulenz der angewandten Kultur und dem gewählten Infektionsmodus abhängig waren. Diese Störungen sind vollkommen analog denen, die durch die Virulenzschwankungen der Bakterien bei der Wertbemessung der bakteriziden Sera bedingt werden, und lassen sich hier wie dort gleichfalls mit Leichtigkeit durch Einführung eines Standardtuberkulins von bekanntem Werte überwinden. Durch den einfachen Weg der Einführung eines Standards kann man sich auch bei der Tuberkulinprüfung unabhängig machen von dem Grade der Tuberkulose der Tiere, indem man nunmehr den bei der betreffenden Standardtuberkulinserie gefundenen Wert als Maßstab für die Giftigkeit des zu prüfenden Präparates benutzt.

Es stellte sich aber bald die Tatsache heraus, daß es oft trotzdem nicht gelang, glatte Prüfungsreihen zu erhalten, sondern daß die Reihen oft sehr unregelmäßig verliefen. In einer und derselben Serie blieben z. B. oft Meerschweinchen mit hohen Dosen Tuberkulin am Leben, während solche mit wesentlich geringeren Dosen desselben Tuberkulins eingingen. Dieser Uebelstand wird allein durch die individuellen Schwankungen in der Tuberkuloseempfänglichkeit der Tiere bedingt und läßt sich so gut wie ganz ausschalten, wenn man besondere Vorsichtsmaßregeln bei der Auswahl der Versuchstiere und bei der

Infektion befolgt. Man muß für jede Prüfung stets eine große Anzahl Meerschweinchen infizieren und sich durch fortlaufende Wägungen über das Fortschreiten der Tuberkulose bei den einzelnen Tieren vergewissern. Nur solche Meerschweinchen sind zu den Prüfungsversuchen heranzuziehen, deren stetige Gewichtsabnahme beweist, daß sie über die besonders ungleichmäßigen Anfangsstadien der Krankheit hinaus sind.

Auf Grund der von Dönitz gewonnenen Erfahrungen wird die amtliche Prüfung des Tuberkulins in folgender Weise vorgenommen:

Etwa 50 Meerschweinchen von annähernd gleichem Gewicht (350 bis 400 g) werden mit 0,5 mg einer frischen, in 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gleichmäßig aufgeschwemmten, 12—14-tägigen Bouillonkultur subkutan infiziert. Sobald diese Tiere tuberkulös geworden sind, was man an der fortschreitenden Gewichtsabnahme, die in der Regel gegen Ende der dritten Woche einsetzt, erkennen kann, wird ein Vorversuch angestellt zur Prüfung, ob die Meerschweinchen für den eigentlichen Werbemessungsversuch reif sind. Zu diesem Zwecke injiziert man einer Anzahl (2—4) Tieren subkutan steigende Dosen Standardtuberkulin, und zwar 0,3—0,5 ccm. Diese Dosen müssen hinreichen, die Tiere zu töten. Töten sie nicht, so muß man noch einige Zeit mit der Anstellung des Versuches warten. Im anderen Falle folgt sogleich der Prüfungsversuch. Bei diesem setzt man zwei Parallelreihen zu 6 Tieren an. Die erste Reihe der Tiere erhält subkutan steigende Dosen Standardtuberkulin, um die minimal tödliche Dosis zu ermitteln, die zweite Reihe die entsprechenden Dosen des zu prüfenden Präparates, um dessen Wert zu ermitteln. In der Regel wählen wir hierzu (bei positivem Ausfall der Vorprobe) folgende Dosen Tuberkulin: 0,05—0,075—0,1—0,15—0,2—0,3 ccm, da sich gezeigt hat, daß der Titer bei Verwendung reifer Tiere meist bei 0,1 bzw. 0,15 liegt.

Zur genaueren Dosierung der Tuberkulinpräparate benutzen wir bei der Prüfung eine zehnfache Verdünnung der Originalpräparate und injizieren dementsprechend 0,5 ccm bis 3,0 ccm subkutan.

Der Tod der Tiere muß innerhalb der ersten 24 Stunden eingetreten sein und der Sektionsbefund bei den eingegangenen Tieren den für die Tuberkulinwirkung charakteristischen Befund zeigen.

Aus dem Verlauf beider Prüfungsreihen ergibt sich durch Vergleich der Wert des zu prüfenden Präparates. Als vollwertig wird ein Tuberkulin angesehen, wenn in der Prüfungsreihe die gleichen Dosen genügten, um die Tiere zu töten, wie beim Standardpräparat. Ist das zu prüfende Präparat minderwertig, so wird es beanstandet; wirkt es kräftiger, so wird der Fabrik mitgeteilt, wie stark das Tuberkulin zu verdünnen ist, damit seine Wirkung der des Standardtuberkulins entspricht.

Nach diesem Verfahren ist es, wie Otto (139) und Berghaus (21) berichtet haben, bei Beachtung der genannten Vorsichtsmaßregeln und Vermeidung sonstiger Fehlerquellen möglich gewesen, durchaus zufriedenstellende Resultate zu erzielen.

Bei einem gleichwertigen Präparat verläuft der Prüfungsversuch etwa in der Weise, wie es das nachstehende Protokoll zeigt:

Tabelle 18.

Prüfung des Tuberkulins x.

Dosis in ccm	Standardtuberkulin			Tuberkulin x		
	Meerschw.	Ergebnis	Bemerkung	Meerschw.	Ergebnis	Bemerkung
0,05	1	lebt	.	7	lebt	.
0,075	2	”	.	8	”	.
0,1	3	† 1	Sekt.-Befd. typisch	9	† 1¼	Sekt.-Bfd. typisch
0,15	4	† 1	dgl.	10	† 1	dgl.
0,2	5	lebt	Tier fällt aus!	11	† 1	”
0,3	6	† 1	Sekt.-Befd. typisch	12	† 1	”

Natürlich können, wie bei den Serumprüfungen, so auch bei der Prüfung der Tuberkuline gelegentlich einmal Tiere ausfallen, wie in vorliegendem Falle Tier 5 in der Standardreihe. Es handelt sich hier um vereinzelte resistentere Tiere, durch deren Ausfall indes die Wertbestimmung des betreffenden Präparates nicht gestört wird.

Literatur.

1) Aronson, H., Untersuchungen über Streptokokken- und Antistreptokokkenserum. Berl. klin. Wochenschr., 1902, Nr. 42 u. 43. — Diskussionsbemerkungen zum Vortrage F. Meyers über Streptokokkenheilserum. Deutsche med. Wochenschr., 1903, Nr. 25.
2) Arrhenius und Madsen, Toxines et Antitoxines. Le poison diphthérique. Centralbl. f. Bakt., Bd. 36, 37 u. 39, 1905.
3) Arthus und Stawska, Venins et antivenins. Compt. rend. acad. des scienc., T. 153, 1911.
4) Aschoff, Ehrlichs Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen Immunisierungsprozesse. Jena 1902.
5) Auché, B., Pouvoir opsonique du sérum antidysentérique. Compt. rend. Soc. de Biol., 1908, No. 16.
6) Bächer und Hachla, Zur Kritik der Prüfungsmethoden des Meningokokkenserums. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 5, 1910.
7) — und Laub, Zur Wirkungsweise des Dysenterieserums. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 4, 1910.
8) Bail, O., Untersuchungen über Typhus- und Choleraimmunität. Arch. f. Hyg., Bd. 52, 1905.
9) v. Behring, Die ätiologisch-therapeutischen Bestrebungen der Gegenwart. Deutsche med. Wochenschr., 1893.
10) — Allgemeine Therapie der Infektionskrankheiten. Berlin u. Wien, Urban u. Schwarzenberg, 1899.
11) — Die Wertbestimmung des Tetanusantitoxins und seine Verwendung in der menschenärztlichen und tierärztlichen Praxis. Deutsche med. Wochenschr., 1900, Nr. 2.

12) v. Behring, Aetiologie und ätiologische Therapie des Tetanus. v. Behrings Beitr. z. exp. Therap., 1904, Heft 7.
13) — und Boer, Ueber die quantitative Bestimmung von Diphtherieantitoxinlösungen. Deutsche med. Wochenschr., 1894, Nr. 21.
14) — — Die Wertbestimmung des Diphtherieheilserums. Ges. Abhandlg. z. ätiol. Therap. von anst. Krankh., 2. Teil.
15) — und Knorr, Ueber den Immunisierungswert und Heilwert des Tetanusheilserums bei weißen Mäusen. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 13, 1893.
16) — und Ransom, Ueber Tetanusgift und Tetanusantitoxin. Deutsche med. Wochenschr., 1898, Nr. 12.
17) — und Kitasato, Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Tieren. Deutsche med. Wochenschr., 1890, Nr. 49.
18) — und Wernicke, Ueber Immunisierung und Heilung von Versuchstieren bei der Diphtherie. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 12, 1892.
19) Belfanti, Ueber antitoxisches und antimikrobisches (bilaventes) Diphtherieserum. Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, 1908.
20) Berghaus, Ueber die Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu seinem Heilwert. Centralbl. f. Bakt., Bd. 48 u. 50, 1909.
21) — Bemerkungen zum Aufsatz des Herrn Hendrik E. Reeser „Das Tuberkulin“. Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, 1908.
22) Berichte über die Wertbestimmung des Pariser Pestserums. Klin. Jahrb., 1902.
23) Besredka, De l'anti-endotoxine typhique et des anti-endotoxines en général. Annales de l'Institut Pasteur, T. 20, 1906.
24) Bingel, A., Ueber Behandlung der Diphtherie mit gewöhnlichem Pferdeserum. Arch. f. klin. Med., Bd. 125, 1918.
25) Blumenau, N. R., Ueber die aktive antidiphtherische Immunisation der Kinder nach dem Prinzip von S. K. Dzerjgowsky. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 74, 1911.
26) Blumenthal, G., Ueber den Einfluß der Karbolsäure auf die Durchlässigkeit der Magenwandung für Eiweißstoffe. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 28, 1919.
26a) — Die Wertbestimmung des Genickstarreserums. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 74, 1913.
27) Boehncke, K. E., Ueber die Haltbarkeit des Diphtherie- und Tetanusserums. Arb. a. d. Inst. f. exp. Therap. zu Frankfurt a. M., Heft 5, 1913.
28) — Praktische Ergebnisse der Heilserumkontrolle. Deutsche med. Wochenschr., 1914, Nr. 11.
29) — Die Wertbemessung des Meningokokkenserums vom prüfungstechnischen Standpunkt. Arb. a. d. Inst. f. exp. Therap. in Frankfurt a. M., Heft 5, 1913.
30) — Zur Methodik des bakteriotropen Reagenzglasversuches. Centralbl. f. Bakt., Bd. 67, 1913.
31) — Die Serumprüfung und ihre theoretischen Grundlagen. Paul Ehrlich-Festschrift. Jena, G. Fischer, 1914.
32) Bonhoff, Versuche über die Möglichkeit der Uebertragung des Rotzkontagiums mittels Diphtherieheilserums. Berl. klin. Wochenschr., 1897, Nr. 5.
33) Bordet, J., Les leucocytes et le propriétés actives du sérum chez les vaccinés. Annales de l'Institut Pasteur, 1895.
34) — Contribution à l'étude du sérum antistreptococcique. Ebenda, 1897.
35) — et Gengou, Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. Ebenda, 1901, No. 5.
36) Bruck, C., Experimentelle Beiträge zur Immunität gegenüber der Schweineseuche. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 47, 1904.
37) — Wesen, Bedeutung und experimentelle Stützen der Ehrlichschen Seitenkettentheorie. Berlin, Mod. ärztl. Bibliothek, 1906.
38) Brüstlein, Ueber die Beziehungen des nach Ehrlichs Methode bestimmten Antitoxingehaltes zu dessen Heilwert. Arb. a. d. Inst. z. Erforschung der Infektionskrankh. in Bern, Heft 3, 1909.
39) Castellani, A., Ueber das Verhältnis der Agglutinine zu den Schutzkörpern. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 37, 1901.
40) Colombo, G. L., Ueber die Komplementbindung als Prüfungsmethode der Meningokokken- und Gonokokkensera und die Spezifität ihrer Ambozeptoren. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, 1911.
41) Cruveilhier, De la valeur thérapeutique de l'antitoxine dans le sérum antidiphthérique. Annales de l'Institut Pasteur, 1905.
42) Denys, Compte-rendu des travaux exécutés sur le streptocoque pyogène. Centralbl. f. Bakt., Bd. 24, 1898.
43) — und Lecleff, La Cellule, 1895 (zitiert nach Bordet, 34).
44) Deutsch, L., Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques. Annales de l'Institut Pasteur, T. 13, 1899.

45) Dönitz, W., Ueber das Antitoxin des Tetanus. Deutsche med. Wochenschr., 1897, Nr. 27.
46) — Untersuchungen über die Wertbestimmung des gewöhnlichen Tuberkulins. Klin. Jahrb., Bd. 7, 1898.
47) — Ueber die Grenzen der Wirksamkeit des Diphtherieheilserums. Arch. pharmacodynam., Bd. 5, 1899.
48) Dopter, Action antiendotoxique du sérum antiméningococcique préparé par inoculation intraveneuse de cultures vivantes de méningocoques. Compt. rend. Soc. Biol., T. 66, 1909.
49) v. Dungern, Die Antikörper. Jena, Gustav Fischer, 1902.
50) — Beitrag zur Kenntnis der Bindungsverhältnisse für die Vereinigung von Diphtheriegift und Antiserum. Deutsche med. Wochenschr., 1904.
51) Ehrlich, P., Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Ueber Ricin. II. Ueber Abrin. Deutsche med. Wochenschr., 1891.
52) — Die staatliche Kontrolle des Diphtherieheilserums. Berl. klin. Wochenschr., 1896, Nr. 20.
53) — Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Klin. Jahrb., Bd. 6, 1897.
54) — Ueber die Konstitution des Diphtheriegiftes. Deutsche med. Wochenschr., 1898, Nr. 38.
55) — Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Berlin, Aug. Hirschwald, 1904.
56) — Schlußbetrachtungen. 8. Band der speziellen Pathologie und Therapie, herausgeg. v. A. Nothnagel. Wien 1901.
57) — Die Giftkomponenten des Diphtherietoxins. Berl. klin. Wochenschr., 1903, Nr. 35—37.
58) — Quelles sont les meilleurs méthodes pour mesurer l'activité des sérums? XIII. Congrès intern. Bruxelles, 1903.
59) — Kossel und Wassermann, Ueber Gewinnung und Verwendung des Diphtherieheilserums. Deutsche med. Wochenschr., 1894.
60) — und Wassermann, Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für öffentliche Gesundheitspflege in Berlin. Hyg. Rundschau, 1894, Nr. 2.
61) Ficker, M., Methoden der aktiven Immunisierung einschließlich Herstellung von Antigenen. — Methoden der Antikörperdarstellung. Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle u. v. Wassermann, 2. Aufl., Bd. 2, 1913.
62) Flexner, Experimental cerebrospinal meningitis and its serum treatment. Journ. americ. med. assoc., Vol. 47, 1906.
63) — Experimentelle Zerebrospinalmeningitis und ihre Serumbehandlung. Centralbl. f. Bakt., Bd. 43, 1907.
64) — Biology cf diplococcus intracellularis. — Concerning a serum-therapy for experim. infection with diplococcus intracellularis. Journ. of experim. med., Vol. 9, 1907.
65) — und Jobling, Serum treatment of epidemic cerebrospinal meningitis. Ebenda, Vol. 10, 1908.
66) Fukuhara, Y., Die neue Methode zur Bestimmung des antitoxischen Dysenterieserums. Festschr f. Aihiko Sata. Tokio 1920.
67) — und Yoshioka, Die neue Methode zur Bestimmung des Typhusserums. Ebenda.
68) Gaffky, G., und Heubner, O., Ueber die Gefahren der Serumkrankheit bei der Schutzimpfung mit Diphtherieheilserum. Veröffentl. a. d. Geb. d. Med.-Verwalt., Bd. 2, 1913, Heft 8.
69) Gengou, Sur les sensibilisatrices des sérums actifs contre les substances albuminoides. Annales de l'Institut Pasteur, T. 16, 1902.
69a) Georgi, W., Ueber eine ausflockende Wirkung des Diphtherieserums. Med. Klinik, 1920, Nr. 41.
70) Hahn, B., Ueber Diphtheriedurchseuchung und Diphtherieimmunität. Deutsche med. Wochenschr., 1912, Nr. 29.
71) Heller, O., und Krumbein, F., Die Immunisierung größerer Tiere und die Serumgewinnung. Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle und v. Wassermann, 2. Aufl., Bd. 3, 1913.
72) Jochmann, Versuche zur Serodiagnostik und Serotherapie der epidemischen Genickstarre. Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 20.
73) — Zur Prophylaxe der Diphtherie. Med. Klinik, 1913, Nr. 24.
74) Issaeff, Untersuchungen über die künstliche Immunität gegen Cholera. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 16, 1894.
75) Karasawa und Schick, Untersuchungen über den Gehalt des menschlichen Serums an Schutzkörpern gegen Diphtherie. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 72, 1910.

76) Kissling, Fünfte Mitteilung über v. Behrings Diphtherievakzine. Deutsche med. Wochenschr., 1913, Nr. 51.
77) Kleinschmidt, H., Zur spezifischen Therapie und Prophylaxe der Diphtherie. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 86, 1917.
78) — Der Diphtherieantitoxingehalt des menschlichen Blutserums, seine Entstehung und seine Bewertung. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 78, 1913.
79) Knorr, A., Experimentelle Untersuchungen über die Grenzen der Heilungsmöglichkeit durch Tetanusheilserum. Habilitationsschr. Marburg, 1895.
80) Koch, R., Weitere Mitteilungen über das Tuberkulin. Deutsche med. Wochenschrift, 1891, Nr. 43.
81) Kolle, W., Heller und de Mestral, Die Wertbemessung des Dysenterieserums. Deutsche med. Wochenschr., 1908, Nr. 19.
82) — und Otto, Vergleichende Wertprüfungen von Pestserum verschiedener Herkunft. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 40, 1902.
83) — — Weitere Untersuchungen über die Pestimmunität. Ebenda, Bd. 48, 1904.
84) — Joseph und Schlossberger, Untersuchungen über die Avidität der Diphtherieantitoxine und über die Polyvalenz der Diphtheriesera. Arb. a. d. Inst. f. exp. Therapie u. d. Georg Speyer-Hause in Frankfurt a. M., Heft 8, 1919.
85) — und Schlossberger, Zur Frage der Heilwirkung des Diphtherieserums. Med. Klinik, 1919, Nr. 1, 4, 23, 24 u. 31; Deutsche med. Wochenschr., 1920, Nr. 25.
86) — und Wassermann, A., Versuche zur Gewinnung und Wertbestimmung eines Meningokokkenserums. Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 16.
87) — — Untersuchungen über Meningokokken. Klin. Jahrb., Bd. 15, 1906.
88) Kraus, R., Zur Frage der Avidität der Diphtherieantitoxine. Deutsche med. Wochenschr., 1920, Nr. 25.
89) — und Bächer, Ueber Meningokokkenserum. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, 1909.
90) — — Ueber Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu dessen Heilwert. Centralbl. f. Bakt., Referate, Bd. 57, Beiheft, 1913.
91) — und Dörr, R., Ueber Meningokokkengifte und Gegengifte. Wien. klin. Wochenschrift, 1908, Nr. 1.
92) — — Die Wertbemessung des Dysenterieserums. Deutsche med. Wochenschr., 1908, Nr. 27.
93) — und Schiffmann, Zur Frage der Bildungsstätten der Antikörper. Wien. klin. Wochenschr., 1905, Nr. 40.
94) — und Schwoner, Ueber Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu dessen Heilwert. Centralbl. f. Bakt., Bd. 47, 1908; Zeitschr. f. Immunitätf., Bd. 1 u. 2, 1909.
95) Kretz, R., Technik der Antikörpererzeugung an großen Tieren (Diphtherieserumgewinnung am Pferde). Handb. d. Techn. u. Meth. d. Immunitätsf., Bd. 2, 1909.
96) Krumbein und Diehl, Neue Untersuchungen zur Wertbestimmung des Meningokokkenserums. Arb. a. d. Inst. z. Erforsch. d. Infektionskrankh. in Bern, Heft 2, 1908.
97) — und Schatiloff, Untersuchungen über das Meningokokkenserum. Deutsche med. Wochenschr., 1908.
98) Kutscher und Meinicke, Vergleichende Untersuchungen über Paratyphus-, Enteritis- und Mäusetyphusbakterien und ihre immunisatorischen Beziehungen. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 52, 1906.
99) Lazarus, Ueber antitoxische Wirkung des Blutserums Choleraheilter. Berl. klin. Wochenschr., 1892, Nr. 43 u. 44.
100) Levaditi, C., Technik der Gewinnung antibakterieller und antitoxischer Immunsera an großen Tieren. Handb. d. Techn. u. Meth. d. Immunitätsf., Bd. 2, 1909.
100a) — Antitoxische Prozesse. Jena, G. Fischer, 1905.
101) Lindemann, Ueber Tropine und Opsonine im Diphtherieserum. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 36, 1911.
102) v. Lingelsheim, Ueber die Wertbestimmung der Tuberkulosegiftpräparate. Deutsche med. Wochenschr., 1898, Nr. 37.
103) Lignières und Spitz, zit. nach Otto und Boehncke, 142a.
104) Lorenz, Schutzimpfungsversuche gegen Schweinerotlauf. Deutsche Zeitschr. f. Tiermedizin u. vergl. Pathol., Bd. 21, 1895. (Centralbl. f. Bakt., 1896.)
105) Macfadyen, A., und Rowland, S., Upon the intercellular constituents of the typhoid bacillus. Centralbl. f. Bakt., Bd. 34, 1904, Heft 7/8.
106) — — Ueber die intrazellulären Toxine gewisser Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt., Bd. 35, 1904.
107) Madsen, Th., Ueber Messung der Stärke des antidiphtherischen Serums. Zeitschrift f. Hyg., Bd. 24, 1897.
108) Martin und Cherry, The nature of the antagonism between toxins and antitoxins. Brit. med. Journ., 1898; Proc. of the R. Society, 1898.

109) Martin, Prevot et Loiseau, Examen comparativ des pouvoirs antitoxique et agglutinant du sérum antidiphthérique: leur valeur thérapeutique. Compt. rend. de la Soc. de Biol., 1910.
110) Marx, E., Experimentelle Untersuchungen über die Beziehung zwischen dem Gehalt an Immunitätseinheiten und dem schützenden und heilenden Wert der Diphtherieheilsera. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 38, 1901.
111) — Mitteilungen aus der prüfungstechnischen Praxis. Festschr. f. Rob. Koch. Jena, Gustav Fischer, 1903.
112) — Die Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxins. Centralbl. f. Bakt., Bd. 36, 1904.
113) — Die Wertbestimmung des Schweinerotlaufserums. Deutsche tierärztl. Wochenschrift, 1901, Nr. 6.
114) — Die experimentelle Diagnostik, Serumtherapie und Prophylaxe der Infektionskrankheiten, 3. Aufl. Berlin, A. Hirschwald, 1914.
115) Marxer, A., Technik der Impfstoffe und Heilsera. Braunschweig, F. Vieweg & Sohn, 1915.
116) Menabuoni, Sulla presenza in circulo di tossino nella difterite. Riv. de clin. pediatr., 1910.
117) Mentz von Krogh, Ist die Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin eine Adsorptionsverbindung? Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 68, 1911.
118) Metschnikoff, E., Immunität bei Infektionskrankheiten. (Deutsch von E. Meyer.) Jena, Gustav Fischer, 1902.
119) Meunes, Das Antipneumokokkenserum und der Mechanismus der Immunität des Kaninchens gegen den Pneumococcus. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 25, 1897.
120) Michaelis, L., Die Bindungsgesetze von Toxin und Antitoxin. Berlin, Gebr. Bornträger, 1905.
121) Morgenroth, J., Untersuchungen über die Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Konstitution des Diphtheriegiftes. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 48, 1904.
121a) — und Ascher, Zur Kenntnis der Beziehungen zwischen Toxin und Antitoxin. Centralbl. f. Bakt., Bd. 59, 1911.
122) Moses, Ueber Dysenterieserum und seine Wertbestimmung. Mem. d. Inst. Oswaldo Cruz, Bd. 2, 1910.
123) Nedrigailoff, Zur Frage über die Bedeutung der Fixatoren und Stimuline im bakteriziden Serum. Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, 1906.
123a) Neisser, M., Bemerkungen zu der Arbeit von Sahli: Ueber das Wesen und die Entstehung der Antikörper. Schweizer. med. Wochenschr., 1921, Nr. 12.
124) Neisser, M., und Wechsberg, F., Ueber eine neue einfache Methode zur Beobachtung von Schädigungen lebender Zellen und Organismen (Bioskopie). Münch. med. Wochenschr., 1900, Nr. 37.
125) — — Ueber die Wirkungsart bakterizider Sera. Münch. med. Wochenschr., 1901, Nr. 18.
126) Neufeld, F., Zur Wertbestimmung von Tuberkulosegiftpräparaten durch intrazerebrale Injektion. Deutsche med. Wochenschr., 1899, Nr. 13.
127) — Ueber die Wirkungsweise und Wertbestimmung des Genickstarreserums. Med. Klinik, 1908, Nr. 30.
128) — Weitere Untersuchungen über die Wertbestimmung des Genickstarreserums. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 34, 1910.
129) — Bakteriotropine und Opsonine. Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kolle und v. Wassermann, 2. Aufl., Bd. 2, 1913.
130) — und Haendel, Ueber den Zusammenhang von Heilwert und Antitoxingehalt des Diphtherieheilserums. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 38, 1911.
131) — — Zur Frage der Serumtherapie der Pneumonie und der Wertbestimmung des Pneumokokkenserums. Berl. klin. Wochenschr., 1912.
132) — und Hüne, Untersuchungen über bakterizide Immunität und Phagozytose, nebst Beiträgen zur Frage der Komplementablenkung. Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt, Bd. 25, 1907; Centralbl. f. Bakt., Referate, Bd. 38, Beiheft, 1906.
133) — und Lindemann, Beitrag zur Kenntnis der serumfesten Typhusstämme. Centralbl. f. Bakt., Referate, Bd. 54, Beiheft, 1912.
134) — und Rimpau, Ueber die Antikörper des Streptokokken- und Pneumokokkenserums. Deutsche med. Wochenschr., 1904, Nr. 40.
135) — und Rimpau, Weitere Mitteilung über die Immunität gegen Streptokokken und Pneumokokken. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 51, 1905.
136) — und Ungermann, Ueber experimentell erzeugte Pneumonien und ihre Beeinflussung durch Antipneumokokkenserum. Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 54, 1912.

136a) Nicolle, Césari und Debains, Études sur la précipitation mutuelle des anticorps et des antigènes. Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 34, 1920.
137) Nicolle, Frasey, Debains und Nicolas, Recherches sur la préparation des sérums antimicrobiens et antitoxiques chez le cheval. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1920, No. 5.
138) Onaka, M., Ueber Meningokokkenserum. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 66, 1910.
139) Otto, R., Prüfungstechnische Erfahrungen bei der Wertbestimmung des Tuberkulins. Klin. Jahrb., Bd. 13, 1904.
140) — Das Theobald Smithsche Phänomen. v. Leuthold-Gedenkschrift. Berlin, Hirschwald, 1906.
141) — Ueber die Haltbarkeit der Heilsera in den tropischen und subtropischen Zonen. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg., Bd. 10, 1906.
142) — Ueber den Gehalt des Blutes an Diphtherieantitoxinen bei gesunden Erwachsenen, Rekonvaleszenten und Bazillenträgern, nebst Bemerkungen über die Bedeutung der letzteren bei der Diphtherie. Deutsche med. Wochenschr., 1914, Nr. 11.
142a) Otto und Boehncke, Die Wertbemessung der Schutz- und Heilsera. Handb. d. pathogenen Mikroorganismen von Kolle und v. Wassermann, 2. Aufl., Bd. 2, 1913.
143) — und Höfer, Die Prophylaxe der Serumkrankheit, im besonderen durch antianaphylaktische Schutzimpfung. Zeitschr f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 80, 1915.
144) — und Sachs, H., Ueber Dissoziationserscheinungen bei der Toxin-Antitoxinverbindung. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie, 1906.
145) Pfeiffer, R., Ueber die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbazillen. Deutsche med. Wochenschr., 1894.
146) — Weitere Untersuchungen über die spezifischen Antikörper der Cholera. Zeitschrift f. Hyg., Bd. 20, 1895.
147) — und Bessau, Zur Frage der Antiendotoxine bei Typhus abdominalis. Centralblatt f. Bakt., Bd. 56, 1910.
148) — — Ueber die Grundlagen einer Serumtherapie bei Typhus abdominalis. Münch. med. Wochenschr., 1912, Nr. 35.
149) — und Issaeff, Ueber die spezifische Bedeutung der Choleraimmunität. Deutsche med. Wochenschr., 1894.
150) — und Marx, Die Bildungsstätte der Choleraschutzstoffe. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 37, 1898; Deutsche med. Wochenschr., 1898.
151) v. Pirquet und Schick, Zur Theorie der Inkubationszeit. Wien. klin. Wochenschrift, 1903, Nr. 26 u. 45.
152) — — Die Serumkrankheit. Leipzig u. Wien, Deuticke, 1902.
153) — — Ueberempfindlichkeit und beschleunigte Reaktion. Münch. med. Wochenschrift, 1906, Nr. 2.
154) Römer, P., Die Ehrlichsche Seitenkettentheorie und ihre Bedeutung für die medizinischen Wissenschaften. Wien, A. Hölder, 1904.
155) — P. H., Ueber den Nachweis sehr kleiner Mengen des Diphtheriegiftes. Zeitschrift f. Immunitätsf., Bd. 3, 1909.
156) Rosenau, M. J., The immunity unit for standardizing diphtheria antitoxin. Washington, Gov. Print. Off., 1905.
157) — and Anderson, John, F., A study of the cause of sudden death following the injection of horse serum. Washington 1906.
158) — — The standardization of tetanus antitoxin. Hyg. Laboratory, Bullet. No. 43, Washington 1908.
159) Roux, E., Mésure de l'activité des sérums. Verhandl. d. 10. u. 13. internat. Kongr. f. Hyg. u. Dermographie in Paris (1900) u. in Brüssel (1903).
160) — Martin et Chaillon, 300 cas de diphthérie traités par le sérum antidiphthérique. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1894.
161) Ruppel, Ueber den Diplococcus intracellularis meningitidis und seine Beziehungen zu den Gonokokken. Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 34.
162) Ruszny ák, Die Wirkungsweise des Antitoxins. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 10, 1911.
163) Sachs, H., Bericht über die Tätigkeit des Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. im Berichtsjahr 1916. Veröffentl. a. d. Geb. d. Med.-Verw., Bd. 7, 1918.
164) — und Georgi, Zur Wertbemessung des antitoxischen Dysenterieserums. Med. Klinik, 1918, Nr. 25.
164a) Sahli, Ueber das Wesen und die Entstehung der Antikörper. Schweizer. med. Wochenschr., 1920, Nr. 50 u. 51.

165) Salge, Ueber den Durchtritt von Antitoxin durch die Darmwand des menschlichen Säuglings. Jahrb. f. Kinderheilk. usw., N. F. Bd. 60, Heft 1.
166) Schottelius, Ueber das Toxin und das Antitoxin der Dysenteriebazillen. Med. Klinik, 1908, Nr. 32.
167) Schubert, Versuche über Wertbemessung des Sobernheimschen Milzbrandserums. Inaug.-Diss. Gießen, 1903.
167 a) Schürmann, W., Methoden der Immunisierung. Antisera. Technik der Gewinnung, Auswertung und Anwendung. Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden, Abt. XIII, 1920.
168) Shiga, K., Ueber die Typen der Dysenteriebazillen und das universale Dysenterieserum. Saikingakuzasshi, 1906, Nr. 128.
169) — Typen der Dysenteriebazillen, ihr epidemiologisches Verhalten und serotherapeutische Studien. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 60, 1908.
170) Sobernheim und Jacobitz, Ueber die Wirkungsweise und Wirkungsgrenze der antibakteriellen Heilsera. Berl. klin. Wochenschr., 1904, Nr. 26 u. 27.
171) Späth, Infektion und Immunität bei Schweinerotlauf. Münch. med. Wochenschrift, 1912, Nr. 26.
172) Steinhardt, E., und Banzhaf, Is the present method for standardizing diphtheric serum according to antitoxin units therapeutically accurate? Journ. of infect. diseases, Vol. 5, 1908; Proc. of Soc. for experim. biol. med., Vol. 5, 1907.
173) Töpfer und Jaffé, Untersuchungen über die Beziehungen von Bakterizidie in vitro und im Tierversuch an Typhus- und Paratyphusbazillen mit verschiedenen spezifischen Serumproben. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 52, 1906.
174) Tizzoni, Sul modo di terminare la potenza del sero antitetanico col methodo della mescolana in vitro. Mem. della r. Accad. della science dell'Instituto di Bologna, Vol. 8, Ser. 5, 1899—1900.
175) Uffenheimer, A., Experimentelle Studien über die Durchgängigkeit der Wandungen des Magendarmkanals neugeborener Tiere für Bakterien und genuine Eiweißstoffe. Arch. f. Hyg., Bd. 55, Heft 1/2.
176) Ungermann und Kandiba, Ueber quantitative Verhältnisse bei der Antikörperwirkung. Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt, Bd. 40, 1912.
177) Vaillard, L., et Dopter, Ch., Le sérum antidysentérique. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1906, No. 5.
178) Viereck, Technik und theoretische Bemerkungen zur Anwendung des neuen Diphtherieschutzmittels. Deutsche med. Wochenschr., 1913, Nr. 21.
179) Voges, O., und Schütz, W., Ueber Impfungen zum Schutze gegen den Rotlauf der Schweine und zur Kenntnis des Rotlaufbazillus. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 28, 1898.
180) Wassermann, A., Experimentelle Untersuchungen über einige theoretische Punkte der Immunitätslehre. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 22, 1896.
181) — Weitere Mitteilungen über Seitenkettenimmunität. Berl. klin. Wochenschr., 1898, Nr. 10.
182) — und Citron, J., Ueber die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper. Zeitschrift f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 50, 1905.
183) — — Die lokale Immunität der Gewebe und ihre praktische Wichtigkeit. Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 15.
184) — — Zur Bildung der bakteriellen Angriffsstoffe im lebenden Organismus. Deutsche med. Wochenschr., 1905, Nr. 28.
185) — und Leuchs, Ueber die Serumtherapie der Genickstarre. Klin. Jahrb., Bd. 19, 1908.
186) — und Ostertag, Ueber polyvalente (multipartiale) Sera, mit besonderer Berücksichtigung der Immunität gegenüber den Erregern der Schweineseuche. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 47, 1904.
187) Wolff, A., Ueber Grundgesetze der Immunität. Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, 1905.
188) Wright, E. A., Ueber die Antikörper des Streptokokken- und Pneumokokkenserums. Deutsche med. Wochenschr., 1904, Nr. 52.
189) — und Douglas, Experimentelle Untersuchungen über die Rolle der flüssigen Blutbestandteile bei der Phagozytose. Verhandl. d. Royal Society, Vol. 72. (Centralbl. f. Bakt., Referate, Bd. 35, 1904.)

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 4910