ARBEITEN

AUS DEM

KÖNIGLICHEN INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE ZU FRANKFURT A. M.

HERAUSGEGEBEN VON

GEH. MED.-RAT PROF. DR. P. EHRLICH

Heft II.

(AUS DER PRÜFUNGSTECHNISCHEN ABTEILUNG):

R. Otto, Die staatliche Prüfung der Heilsera.

Mit 8 Figuren

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1906

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Soeben begann zu erscheinen:

Arbeiten aus dem Königlichen Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. Herausgegeben von Geh. Med.-Rat Prof. Dr. **P. Ehrlich.** Heft 1. (Aus der Abteilung für Krebsforschung): **H. Apolant,** Die epithelialen Geschwülste der Maus. **P. Ehrlich,** Ueber ein transplantables Chondrom der Maus. **P. Ehrlich,** Experimentelle Carcinomstudien an Mäusen. Mit 6 Tafeln. Preis: 9 Mark.

Die neutrophilen weissen Blutkörperchen bei Infektionskrankheiten. Von Privatdozent Dr. **Joseph Arneth,** I. Assistenzarzt der medizin. Klinik am kgl. Juliushospitale zu Würzburg. Mit 11 grösseren und 233 kleineren Blutbildtabellen. 1904. Preis: 10 Mark.

Münchener Med. Wochenschrift v. 21. Juni 1904:

Die überaus sorgfältige und mühevolle Arbeit Arneths bedeutet einen Merkpunkt in der Geschichte der Blutforschung, speziell für die Frage der Leukozytenzählung bei den Infektionskrankheiten.

Die Lektüre der Arbeit, die flüssig und elegant geschrieben, ist dringend zu empfehlen.

Ehrlichs Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen Immunisierungsprozesse. Von Dr. **Ludwig Aschoff,** Prof. in Göttingen. Zusammenfassende Darstellung. Mit 1 Tafel und 16 Textabbildungen. (Abdruck aus: Zeitschrift für Allgemeine Physiologie. Herausgegeben von Dr. Max Verworn in Göttingen. I. Band, 3. Heft, 1902.) Anastatischer Neudruck der Ausgabe von 1902. 1905. Preis: 4 Mark 50 Pf.

Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie. Herausgegeben von Proff. Drr. **v. Baumgarten, Bendz, Bollinger, Bostroem, Chiari, Eppinger, Ernst, Foà, Golgi, Griffini, Hauser, Homén, Klebs, Klemensiewicz, Löwit, Lustig, Marchand, Martinotti, Nauwerck, Naumann, Paltauf, Pertik, Podwyssozki, Reddingius, Ribbert, Schottelius, Schmorl, Spronck, Stilling, Stokvis, Thoma, Tizzoni, Weichselbaum.** Begründet von weil. Dr. **Ernst Ziegler,** Prof. der patholog. Anatomie und allgem. Pathologie in Freiburg i. Br. Herausgegeben von Dr. **F. Marchand** in Leipzig und Dr. **L. Aschoff,** Prof. in Marburg. Vor kurzem wurde vollständig: Bd. XXXVIII. Mit 18 Tafeln und 25 Figuren im Text. Preis des Bandes: 25 Mark.

Die Bakterien des Blutes bei Infektionskrankheiten. Von Dr. **Canon.** Mit 1 Lichtdrucktafel. 1905. Preis: 5 Mark, geb. 6 Mark.

Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie. Begründet von weil. Prof. Dr. **E. Ziegler** in Freiburg in Br. Redigiert von Prof. Dr. **M. B. Schmidt** in Strassburg i. E. **Preis für den Jahrgang 24 Mark.**

Das *Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie* erscheint seit dem 1. Januar 1890, und zwar in dem Umfange von mindestens 65 Bogen jährlich.

Es fehlte zuvor ein Organ, welches alles Wissenswerte aus dem Gebiete der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie ohne Rücksicht, ob dasselbe augenblicklich gerade Gegenstand lebhafter Erörterung ist, zusammenstellt und auf diese Weise ein Werk bildet, das ein vollständiges Bild der wissenschaftlichen Forschung bietet.

Das Blatt enthält

1) Originalmitteilungen und Mitteilungen über neue Untersuchungen. 2) Zusammenfassende Uebersichten. 3) Referate. 4) Systematisch geordnete Uebersichten über die neueste allgemein pathologische und pathologisch-anatomische Literatur aller Länder. *5) Berichte* über Untersuchungs- und Färbungsmethoden, Instrumente und über die in das Gebiet der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie einschlagenden Vorträge und Verhandlungen auf Versammlungen und Kongressen.

ARBEITEN

AUS DEM

KÖNIGLICHEN INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE ZU FRANKFURT A. M.

HERAUSGEGEBEN VON

GEH. MED.-RAT PROF. DR. P. EHRLICH

Heft II.

(AUS DER PRÜFUNGSTECHNISCHEN ABTEILUNG):

R. Otto, Die staatliche Prüfung der Heilsera.

Mit 8 Figuren

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1906

Uebersetzungsrecht vorbehalten.

Die staatliche Prüfung der Heilsera

Von

Stabsarzt **Dr. R. Otto**
Mitglied des Kgl. Instituts für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.

Hierzu 8 Figuren

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung 7

A. Die „staatlich geprüften“ Heilsera und Präparate; die „definitive“ und die „provisorische“ Form der staatlichen Prüfung 9

B. Die Zulassung zur staatlichen Prüfung 13

C. Die „lokale Kontrolle“ an der Fabrikationsstelle 14

D. Die „Prüfung“ der Heilsera im Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. 19

I. Die Prüfung auf Unschädlichkeit 19

II. Die Wertbestimmung 22

a) Die antitoxischen Sera 25

1. Diphtherieheilserum 38

2. Tetanusantitoxin 51

b) Die antibakteriellen Sera 56

1. Schweinerotlaufserum 66

2. Polyvalentes Schweineseucheserum 69

3. Suisepsin 72

4. Galloserin 73

5. Antidysenterieserum 73

6. Antistreptokokkenserum 73

c) Tuberkulin 75

d) Tauruman 79

Literatur 80

Die weitverbreitete Anwendung, welche das Diphtherieheilserum bald nach der Entdeckung der Antitoxine durch von Behring (1, 2) erfuhr, ließ es wünschenswert erscheinen, staatlicherseits für die Herstellung absolut unschädlicher und vollwertiger Serumpräparate Sorge zu tragen, einmal um das Publikum gegen den Vertrieb minderwertiger und fehlerhaft zubereiteter Sera zu schützen und andererseits, um für die richtige Beurteilung der neuen Heilmethode durch Verwendung zweifellos guter Sera von feststehendem Werte eine sichere Grundlage zu schaffen. Dieser Zweck konnte auf zwei Wegen erreicht werden, entweder durch die Verstaatlichung der Serumfabrikation überhaupt oder aber durch die Einführung einer staatlichen Serumkontrolle der für den Handel bestimmten Serumproben. Nachdem sich eine zur Entscheidung dieser Frage im Kais. Gesundheitsamte zusammenberufene Konferenz von Sachverständigen für den letzteren Weg entschieden hatte, wurde dieser gewählt und zugleich durch Kaiserliche Verordnung vom 31. Dezember 1894 das Diphtherieserum dem freien Verkehr entzogen und in die Reihe derjenigen Arzneistoffe aufgenommen, welche nach § 2 der Verordnung vom 27. Januar 1890 betreffend den Verkehr mit Arzneimitteln, nicht außerhalb der Apotheken feilgehalten und verkauft werden dürfen.

Mit der Vornahme der staatlichen Prüfung des Diphtherieserums wurde das unter der Leitung des Geh. Med.-Rats Prof. Dr. Robert Koch stehende Institut für Infektionskrankheiten in Berlin betraut und zu diesem Zwecke an dem genannten Institut eine besondere „Kontrollstation für Diphtherieheilsera“ errichtet.

Diese Kontrollstation begann ihre Tätigkeit am 20. Februar 1895 und wurde im Juni 1896 nach $1^1/_4$-jährigem Bestehen zu einem selbständigen Institut, dem „Institut für Serumforschung und Serumprüfung“ erweitert, zu dessen Leiter Prof. Dr. P. Ehrlich

berufen wurde. Das neue Institut wurde am 1. April 1896 in Steglitz eröffnet, ohne indes lange bestehen zu bleiben. Die durch die Fortschritte auf dem Gebiete der Immunität bedingte Erweiterung der Aufgaben des Instituts machten bald auch eine räumliche Vergrößerung der damals noch in Mietshäusern untergebrachten Anstalt dringend notwendig und führten so zur Errichtung des „Instituts für experimentelle Therapie“ in Frankfurt a. M. Dieses letztere wurde im November 1899 in feierlicher Weise und in Gegenwart von Vertretern der Staats- und städtischen Behörden, sowie der benachbarten Universitäten Marburg und Gießen, von dem Herrn Kultusminister seiner Bestimmung übergeben.

Die dem neuen Institut gestellten Aufgaben waren teils praktischer, teils rein wissenschaftlicher Natur. In ersterer Hinsicht erstreckten sich dieselben:

1) auf die amtliche Prüfung aller der staatlichen Kontrolle unterstellten Heilpräparate (deren Zahl sich inzwischen wesentlich vergrößert hatte) und

2) auf die hygienisch-bakteriologischen Arbeiten, welche für die öffentliche Hygiene der Stadt, sowie für die Krankenhäuser und die Aerzte in Frankfurt a. M. notwendig waren.

Nach der anderen — rein wissenschaftlichen Seite hin — war dem Institut

3) die Aufgabe zu teil geworden, für den Ausbau der Immunitätslehre und speziell der Serumforschung Sorge zu tragen. Diesen Aufgaben entsprechend wurden im Institut drei Abteilungen eingerichtet: eine prüfungstechnische, eine bakteriologisch-hygienische und eine theoretisch-wissenschaftliche. Außerdem ist im Jahre 1902 noch eine spezielle Abteilung für Krebsforschung (mit Hilfe von privater Seite gestifteter Mittel) an dem Institut errichtet worden.

Bei der Wertbestimmung der Heilsera sind nun im Laufe der Jahre eine große Reihe z. Teil rein praktischer Erfahrungen gesammelt worden, welche zur Ausarbeitung ganz bestimmter technischer Maßnahmen bei den amtlichen Serumprüfungen geführt haben. Da bisher eine zusammenhängende Darstellung der auf diesen Erfahrungen begründeten offiziellen Prüfungsmethoden für die verschiedenen Sera und Präparate nirgends erfolgt ist, andererseits aber eine solche von Fachgenossen und Interessenten mehrfach dringend gewünscht wurde, so will ich, einer Aufforderung meines hochverehrten Chefs, des Herrn Geheimrats Ehrlich, nachkommend, im folgenden eine kurze Zusammenstellung unserer prüfungstechnischen Maßnahmen geben.

Alle hier beschriebenen Prüfungsmethoden sind in erster Linie das Resultat der langjährigen Erfahrungen Ehrlichs selbst und der Untersuchungen, welche von ihm und seinen Mitarbeitern, speziell den früheren Leitern der prüfungstechnischen Abteilung, Geheimrat

Prof. Dr. Dönitz und Stabsarzt Prof. Dr. Marx vorgenommen worden sind.

A. Die „staatlich geprüften“ Präparate.

Wie bereits erwähnt, war das erste Präparat, welches der staatlichen Kontrolle unterstellt wurde, und das überhaupt die Veranlassung zur Einrichtung einer staatlichen Serumkontrolle gab, das Diphtherieheilserum. Nachdem dieses Serum durch Kaiserliche Verordnung vom 31. Dezember 1894 dem freien Verkehr entzogen war, wurde der Vertrieb des Serums durch Ministerialerlaß vom 25. Februar 1895 geregelt. In diesem Erlasse wurden über die ordnungsmäßige Aufbewahrung, die Beschaffenheit der abzugebenden Sera und die event. 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 (43).

Für die Beurteilung der Brauchbarkeit einer Serumprobe wurde den Apothekern durch die Aufnahme des Serums in die Pharmakopoe ein bestimmter Anhalt gegeben. In der 4. Ausgabe des Arzneibuches für das Deutsche Reich heißt es auf Seite 328:

„Serum antidiphthericum — Diphtherieheilserum. Blutserum von Pferden, die gegen das Diphtheriegift immunisiert sind. Es wird von den dazu berechtigten Fabrikationsstätten in den Handel gebracht, nachdem es durch das Königlich preußische Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. auf seinen Gehalt an Immunisierungseinheiten (= I.E.), auf Keimfreiheit und Gehalt an Konservierungsmitteln (Phenol oder Trikresol) geprüft und zum Verkauf zugelassen worden ist.

Es wird in flüssiger und fester Form in den Handel gebracht.

Flüssiges und festes Diphtherieheilserum werden nur in Fläschchen abgegeben, deren Verschluß staatlich plombiert ist und welche in einer Aufschrift Angaben über die Fabrikationsstätte, den Antitoxingehalt eines Kubikcentimeters und den des ganzen Inhaltes des Fläschchens, die Kontrollnummer und den Tag[1]) der amtlichen Kontrolle enthalten. Diese Fläschchen befinden sich in lichtdichter Verpackung, welche dieselben Angaben enthält. Die Plomben tragen auf der einen Seite einen Adler oder einen Löwen; die andere Seite gibt die Zahl der im Gesamtinhalt vorhandenen I.E. an.

Das flüssige Diphtherieheilserum stellt eine gelbliche, klare, höchstens einen geringen Bodensatz enthaltende Flüssigkeit dar, welche den Geruch des Konservierungsmittels besitzt. Es wird in Fläschchen von verschiedener Form und Farbe abgegeben, deren Inhalt dem Werte von 100 bis 3000 I.E. entspricht. Die am meisten gebräuchlichen Abfüllungen sind:

No. 0 = 200 I.E.
No. I = 600 I.E. (resp. 500 I.E.).
No. II = 1000 I.E.
No. III = 1500 I.E.

1) Die Angabe des Tages der amtlichen Kontrolle darf laut Ministerialerlaß vom 13. Dez. 1904 in Zukunft wegfallen.

Diphtherieheilserum, welches mehr als 300 I.E. in 1 ccm enthält, gilt als hochwertiges[1]) Serum.

Das feste Diphtherieheilserum ist getrocknetes, hochwertiges Diphtherieheilserum, welches in 1 g mindestens 5000 I.E. enthält und keinerlei antiseptische oder sonstige differente Zusätze erhalten hat. Es stellt gelbe, durchsichtige Blättchen oder ein gelblich-weißes Pulver dar, welches sich mit 10 Teilen Wasser zu einer in Farbe und Aussehen dem flüssigen Diphtherieheilserum entsprechenden Flüssigkeit löst. Es ist in Einzeldosen von je 250 und 1000 I.E. in weißen Glasstöpselfläschchen von 2 oder 6 ccm Inhalt abzugeben. Die Lösung soll mittels sterilisierten Wassers von 1 ccm auf je 250 I.E. in dem Originalfläschchen jedesmal frisch bereitet werden; sie soll bis auf kleine Eiweißflöckchen klar sein und in den Originalfläschchen abgegeben werden.

Serum mit starker bleibender Trübung oder stärkerem Bodensatze sowie Serum einer bestimmten Kontrollnummer, dessen Einziehung verfügt wurde, darf in den Apotheken nicht abgegeben werden.

An einem kühlen Ort und vor Licht beschützt aufzubewahren."

Das Diphtherieserum wird zur Zeit von folgenden Fabriken hergestellt und in den Handel gebracht:

1) von der Chemischen Fabrik auf Aktien, vorm. E. Schering, Berlin;

2) von den Farbwerken, vorm. Meister, Lucius & Brüning, Höchst a. M.;

3) von der chemischen Fabrik E. Merck, Darmstadt;

4) von dem Serum-Laboratorium Ruete-Enoch, Hamburg.

Ein Jahr nach der Einführung der staatlichen Kontrolle für das Diphtherieheilserum wurde auch das Tetanusantitoxin, mit dessen Herstellung sich in Deutschland zur Zeit die Höchster Farbwerke und das Behringwerk in Marburg befassen, zur staatlichen Prüfung zugelassen. Die endgültige Festsetzung der amtlichen Prüfungsvorschrift erfolgte durch Erlaß vom 2. Februar 1903. Bezüglich der Abgabe in den Apotheken dürfte das Tetanusserum demnächst dem Diphtherieserum gleichgestellt werden, nachdem seit einiger Zeit Verhandlungen eingeleitet sind, welche für den Vertrieb des Tetanusantitoxins die gleichen Bestimmungen festlegen sollen, wie sie für das Diphtherieheilserum bereits bestehen, speziell was die Abgabe des Mittels in den Apotheken, die Verpackung und die Zurücknahme abgeschwächter Sera betrifft. In die Pharmakopoe ist das Tetanusserum bisher noch nicht aufgenommen.

Zu diesen beiden amtlichen Prüfungen kam 1899 die des Rotlaufserums und des Kochschen Tuberkulins.

Staatlich geprüftes Rotlaufserum liefern zur Zeit die Höchster

1) Laut Ministerialerlaß vom 13. Aug. 1904 müssen alle Sera mindestens 350fach sein; als hochwertig bezeichnet man nunmehr in der Prüfungstechnik nur noch Sera, welche mindestens 500 und mehr I.E. in 1ccm enthalten.

Farbwerke („Susserin"), das Serum-Laboratorium Ruete-Enoch, Hamburg, das Seruminstitut Heilsberg (Ostpreußen) und das Pharmazeutische Institut Ludwig Wilhelm Gans, Frankfurt a. M.

Das Tuberkulin wird von den Höchster Farbwerken, dem Serum-Laboratorium Ruete-Enoch-Hamburg, dem Marburger Behringwerk und der Fabrik E. Merck-Darmstadt in den Handel gebracht. Es darf nach der Kaiserlichen Verordnung vom 22. Oktober 1901 nur in den Apotheken abgegeben werden; der Vertrieb des Tuberkulins ist durch Ministerialerlaß vom 24. März 1902 geregelt und darf dasselbe seit dem 1. Juni 1902 nur in amtlich plombierten Fläschchen abgegeben werden.

In dem Arzneibuch für das Deutsche Reich — 4. Ausgabe, S. 395 — heißt es über dieses Präparat: „Tuberculinum Kochi — Tuberkulin. Klare, braune, eigentümlich aromatisch riechende Flüssigkeit, welche nach den Angaben von R. Koch aus glyzerinhaltigen Fleischbrühe-Kulturen der Tuberkelbazillen durch Eindampfen auf ein Zehntel und darauffolgendes Filtrieren gewonnen wird. Tuberkulin ist leicht mit Wasser mischbar und enthält neben dem wirksamen Stoff in 100 Teilen etwa 40 Teile Glyzerin, sowie Bestandteile der Fleischbrühe. Ein Antiseptikum wird dem Tuberkulin nicht zugesetzt.

Tuberkulin unterliegt der staatlichen Aufsicht, welche sich auf seinen gleichbleibenden Gehalt an spezifischem Toxin bezieht, und wird in amtlich plombierten Fläschchen geliefert.

Tuberkulin soll nur in unverdünntem Zustande aufbewahrt werden. Die vom Arzte verordneten Verdünnungen sind jedesmal frisch herzustellen und mit sterilisiertem Wasser oder besser mit Karbolsäurelösung (0,5 : 100) anzufertigen.

An einem kühlen Orte und vor Licht geschützt aufzubewahren."

Für die genannten 4 Präparate ist die staatliche Prüfung eine „definitive und obligatorische".

Diesen definitiven Prüfungen ist im Jahre 1906 noch die des von den Höchster Farbwerken hergestellten Rinderimpfstoffes „Tauruman" angegliedert worden.

In den letzten Jahren sind nun außerdem noch verschiedene Serumpräparate zur staatlichen Prüfung zugelassen, ohne daß dieselbe für sie „obligatorisch und definitiv" gemacht wurde. Es handelt sich hier um eine größere Reihe von Seris, deren theoretisch angenommene Wirksamkeit bisher noch nicht mit der gleichen Sicherheit, wie bei den erstgenannten Präparaten, erwiesen ist, oder doch erst noch in der Praxis erprobt werden soll. Aus diesem Grunde wurde von ihrer endgültigen Unterstellung unter die staatliche Prüfung vor der Hand abgesehen und für sie zunächst eine „provisorische staatliche Prüfung" eingeführt, welche vollständig fakultativ ist. Der Zweck dieser provisorischen Prüfung soll in erster Linie der sein, für die Gleichwertigkeit aller in den Handel gebrachten Präparate

der betreffenden Serumart Sorge zu tragen, um dadurch dem Praktiker bei der Anwendung derartiger Sera von zunächst zweifelhafter praktischer Wirksamkeit durchaus gleichwertige Präparate in die Hand zu geben. Denn es läßt sich annehmen, daß nur dann, wenn dies erreicht ist, es möglich sein wird, sich im Laufe einiger Jahre ein Urteil über den praktischen Heil- und Schutzwert eines Serums bilden zu können. Wenn dann nach dieser Zeit durch das Urteil unparteiischer Vertreter der Praxis festgestellt werden kann, daß die Wirkung eines Serums in der Tat den versprochenen Erfolg gehabt hat, so soll die „definitive" für die „provisorische" Form der Prüfung eintreten, im anderen Falle aber das betreffende Serum nicht weiter zur Prüfung zugelassen werden.

Die „provisorische staatliche Prüfung" bietet also zunächst nur eine Garantie dafür, daß alle Nummern des provisorisch geprüften Serums insofern untereinander gleichwertig sind, als sie mindestens den von der Fabrik angegebenen Wert besitzen. Außerdem bietet sie aber auch noch den Vorteil, daß sie mit ungenügender Sorgfalt hergestellte Sera vom Markt zurückhält, und zwar dadurch, daß 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, welche frei von gröberen Niederschlägen sind, nicht mehr als 0,5 Proz. Phenolzusatz enthalten und deren Keimgehalt an (saprophytischen) Keimen das erlaubte Maß — bei den für die Veterinärpraxis bestimmten Seris sind bis 100 Keime pro Kubikcentimeter 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.

Zur Zeit sind unter dieser Bedingung die nachgenannten Sera der provisorischen staatlichen Prüfung unterstellt:

1) das „Antistreptokokkenserum nach Aronson" der Chemischen Fabrik auf Aktien, vorm. E. Schering, Berlin;

2) das „Suisepsin" (Schweineseuchenserum) und

3) das „Galloserin" (Geflügelcholeraserum) der Farbwerke vorm. Meister, Lucius & Brüning, Höchst a. M.;

4) das „polyvalente Schweineseuchenserum nach Wassermann-Ostertag und

5) das „Antidysenterieserum nach Shiga" des pharmazeutischen Instituts Ludwig Wilhelm Gans, Frankfurt a. M.

Der Umstand, daß dauernd die Zulassung neuer Sera zur „staatlichen provisorischen Prüfung" nachgesucht wird, 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 uns speziell Versuche (121) mit dem von der Firma Merck nach den Angaben des Professors Sobernheim hergestellten Milzbrandserum gezeigt, bei dem es uns in Uebereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen [vergl. Sobernheim (100)] bisher nicht gelungen ist, eine solche quantitativ genau arbeitende Prüfungsmethode zu finden.

B. Die Zulassung zur staatlichen Prüfung.

Beabsichtigt eine Fabrik, eines jener Präparate in den Handel zu bringen, welche bereits der obligatorischen staatlichen Kontrolle unterstellt sind, so hat sie sich mit einem entsprechenden Gesuch an das zuständige preußische Kultusministerium zu wenden (bei nichtpreußischen Fabriken durch Vermittelung der betreffenden Regierung). Die Genehmigung ihres Gesuches wird in diesem Falle allein davon abhängig gemacht werden, daß einmal die Lokalbehörde gegen die Qualifikation des Leiters und die Einrichtung der Fabrik keine Bedenken erhebt, und daß zweitens die Fabrik bestimmte Bedingungen, welche sich auf die Kontrolle des Tierbestandes, die Serumgewinnung und Serumabgabe beziehen, acceptiert.

Handelt es sich dagegen um Sera u. s. w., die bisher der staatlichen Kontrolle noch nicht unterstanden, so ist die beantragte Zulassung der betreffenden Präparate zur staatlichen Prüfung außerdem noch davon abhängig, daß für das Serum u. s. w. eine genaue Wertbemessungsmethode seiner spezifischen Wirksamkeit schon vorhanden 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, sowie der Zahlung bestimmter Prüfungsgebühren folgende:

1. ist der Tierbestand der dauernden Kontrolle eines approbierten Tierarztes zu unterwerfen;
2. ist ein Hauptbuch zu führen, welches ersehen läßt:
   a) die Nummern der Tiere, von denen Blut zur Herstellung des betreffenden Serums genommen ist,
   b) Tag der Blutentnahme, Menge desselben und des erhaltenen Serums,

c) Ergebnis der Wertigkeitsbestimmung des Serums,
d) Tag der Abfüllung und der amtlichen Abnahme des Serums,
e) Tag des Abschlusses der amtlichen Kontrolle und Ergebnis der Kontrolle;

3. ist ein staatlicher Kontrollbeamter anzustellen, der die Einsendung der Proben, die Klausur des Serums während der Prüfung, die Ueberwachung der Abfüllung und die Plombierung auszuüben hat;

4. muß eine bestimmte Literzahl Serum als Mindestmenge zur Prüfung gestellt werden. Von diesem Quantum hat der Kontrollbeamte 4 Fläschchen à 5 ccm einzusenden (NB. beim Diphtherieserum 8 Fläschchen);

5. ist das frische, nicht zersetzte Serum durch Zusatz einer geringen Menge eines Antiseptikums (z. B. 0,5 Proz. Karbol) vor Fäulnis zu schützen. Für die Sera, welche zur Anwendung beim Menschen bestimmt sind, ist absolute Sterilität notwendig; auch für die ausschließlich zur Verwendung in der Veterinärpraxis bestimmten Immunsera ist eine absolute Sterilität zweckmäßig, aber nicht durchaus erforderlich; jedoch sollen Proben, die Zeichen der Zersetzung aufweisen, nicht zugelassen werden;

6. soll mit jeder Prüfung ein Begleitschein nach folgendem Muster eingesandt werden: (siehe S. 15).

Für die Prüfungen der Sera wird vom Staate eine bestimmte Gebühr erhoben, und zwar in der Regel 5 Proz. des Verkaufspreises bei den definitiv und 2,5 Proz. bei den provisorisch geprüften Seris. Für das Diphtherieserum betragen die Gebühren z. Z. für

je	10 l	100- und	200fachen	Serums	200 M.
„	10 „	250	„	„	400 „
„	10 „	300	„	„	480 „
„	10 „	350	„	„	560 „
„	10 „	400	„	„	640 „
„	10 „	450	„	„	720 „
„	10 „	500	„	„	700 „
„	10 „	600	„	„	840 „
„	10 „	700	„	„	980 „
„	10 „	750	„	„	900 „
„	10 „	800	„	„	960 „
„	10 „	900	„	„	1080 „
„	10 „	1000	„	„	1000 „
„	10 „	1100	„	„	1100 „
„	10 „	1200	„	„	1200 „
		u. s. w.			

C. Die lokale Kontrolle an der Fabrikationsstelle.

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 die zweckmäßige Herstellung derselben Sorge trägt. Um letzere genau kontrollieren zu können, sind die Fabriken verpflichtet, über die Gewinnung der Sera ausführlich Buch zu führen.

Begleitschein No. .....
für die staatliche Kontrollstation
zu dem aus .....
in .....
eingesandten .....

Kontroll-(Hauptbuch) No. .....
(entsprechend der Aufschrift auf dem Probefläschchen)
Pferde No. .....
Tag der Blutentziehung .....
Blutmenge in ccm .....
Menge des erhaltenen Serums .....
Prüfungsergebnis in der Fabrik { Versuchstier No. ..... / 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) No. .....
Pferde No. .....
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:
.....

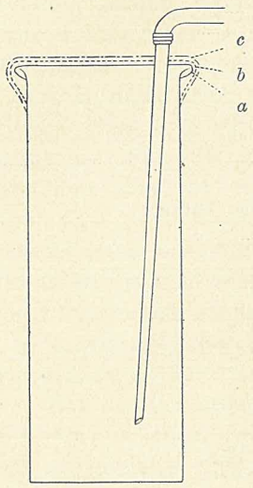
Die Herstellung der Sera in den Fabriken ist in technischer Beziehung vielfach mustergültig ausgearbeitet. Als Serumspender benutzt man in der Regel Pferde, doch werden zur Herstellung bestimmter Sera auch andere Tierspecies verwandt, so z. B. Rinder und Schafe beim Milzbrandserum.

Die Vorteile der Anwendung von Pferden beruhen darin, daß die Tiere verhältnismäßig leicht zu einem hohen Immunitätsgrade gebracht werden können und daß von ihnen sich das Serum durch Aderlaß aus der Halsvene bequem entnehmen läßt. Nur vollständig gesunde und tadellose Pferde dürfen zur Serumgewinnung benutzt werden.

Auf die verschiedenen Immunisierungsmethoden, welche alle auf dem Ehrlich-Behringschen (108) Immunisierungsmodus, speziell dem zuerst von Ehrlich (3, 107) gefundenen Prinzip der Immunitätssteigerung beruhen, kann hier nicht näher eingegangen werden (s. Anm. S. 18). Dagegen will ich die Entnahme des Serums von den Pferden mit einigen Worten skizzieren.

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 (4) haben schon darauf hingewiesen, daß für diese Blutentnahme natürlich nur ein solcher Zeitpunkt zu wählen ist, wo das serumliefernde Tier gesund ist. Als Kriterien hierfür bezeichnen sie:

Fig. 1a.



1) das normale gesunde Aussehen der Tiere,

2) das normale Verhalten von Temperatur und Puls,

3) das normale Körpergewicht, als welches dasjenige anzusehen ist, 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. Im Paltaufschen Institut in Wien verfährt man dabei (um ein Beispiel anzuführen) in folgender Weise [1]). Man macht zunächst mit einem Myrthenblattmesser einen etwa 10 mm 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 derselbe 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 daher bis ca. 50 Aderlässe auf einer 4—5 cm langen Strecke der Vene machen.

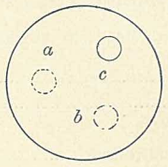


Fig. 1b.

Die Punktion der Vene selbst erfolgt mit einem schlanken Troikart, auf den sich eine Kanüle aufsetzen läßt zu einem Schlauch, der das Blut in den Aderlaßzylinder leitet.

Bei jeder Blutentnahme liefert ein Pferd durchschnittlich 5—6 l Blut, von denen man ungefähr 3 l reines Serum erhält. Das Blut wird in hohen Standgefäßen (Aderlaßzylinder) steril aufgefangen. Diese Zylinder, welche ungefähr 1500 ccm fassen, werden vor der Blutentnahme dreifach verschlossen und mit einem eingeführten Rohr (s. Fig. 1a) versehen, im Dampf sterilisiert. Dieser dreifache 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. 1b). 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 zweckmäßig Heber, deren untere Oeffnung seitlich liegt, so daß man mit ihnen das Coagulum vom Glase abdrängen kann. Der Heber wird durch Auspressen der Luft im Schlauch in Gang gesetzt.

1) Nach einer brieflichen Mitteilung von Herrn Prof. Paltauf an Herrn Geh. Rat Ehrlich.

Da es zeitweise vorkommt, daß das Serum sich ungenügend von dem Blutkuchen abscheidet, so ist man bestrebt gewesen, Methoden zu finden, um die in dem Blutkuchen noch restierenden Serummengen zu gewinnen. Dies hat man z. B. durch besonders konstruierte Apparate, in denen der Blutkuchen nachträglich ausgepreßt wurde, 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 Bakterienkeimen unmöglich wird. Ich möchte daher eine einfache, aber sehr praktische Methode [1]) hier kurz anführen, welche zu dem genannten Zwecke in dem Blumenthalschen chemisch-bakteriologischen Institute in Moskau seit langem angewandt wird und die Durchführung strengster Asepsis gestattet. In die obere Oeffnung des von Bronstein (105) beschriebenen Gefäßes zur Blutentnahme wird vor dem Verschließen [2]) des Gefäßes zwecks Sterilisation ein mit Schrotkörnern gefülltes starkwandiges Fläschchen eingefügt und dessen Hals von außen mit einem Faden so befestigt, daß es an dem Gefäßverschluß hängend frei in dem oberen Teile des Gefäßes schwebt. Hat man nun nach der Gerinnung des Blutes das abgeschiedene Serum aus dem Apparat entleert, so braucht man nur den das Fläschchen haltenden Faden außen zu durchtrennen, um ein Herabfallen desselben auf den Blutkuchen zu bewirken. Der Druck des auffallenden Fläschchens genügt aber, wie die Erfahrung in dem genannten Institut gezeigt hat, um aus dem Blutkuchen die darin noch restierenden Serummengen frei zu machen. Der Vorzug dieses Verfahrens liegt, abgesehen von seiner Einfachheit, darin, daß das Blut völlig aseptisch behandelt werden kann und daß es nur mit Gegenständen aus Glas und z. B. nicht mit Metall in Berührung kommt, da ja letztere Berührung nach der Erfahrung der Praktiker für das Serum durchaus nicht indifferent sein soll.

Zur Konservierung muß das zur staatlichen Prüfung gestellte Serum bestimmungsgemäß einen Zusatz von Desinfektionsmitteln erhalten und zwar verwendet man hierzu meist eine 0,5-proz. Phenollösung. Die Konservierung mit antiseptischen Mitteln ist in Deutschland vorgeschrieben einmal, um bei den Seris, soweit sie für die Veterinärpraxis bestimmt sind, eine Anreicherung der Keime in den nicht sterilen Seris zu verhindern, dann aber auch, um die Möglichkeit einer Uebertragung des in dem Anfangsstadium oft schwer diagnostizierbaren Rotzes von den Pferden durch das Serum auf den Menschen auszuschließen. Nach den Untersuchungen von Bonhoff (5) im hiesigen Institut können sich nämlich die Rotzbacillen in

1) Nach mündlicher Mitteilung des Herrn Dr. Blumenthal-Moskau.

2) Der Verschluß geschieht durch eine doppelte Lage von Papier, zwischen welches eine dünne Wattelage eingeschaltet ist.

derartig konservierten Flüssigkeiten nicht vermehren, sondern werden sogar in kurzer Zeit abgetötet. Es gelang mit Serum, das Rotzbacillen enthielt und mit 0,5-proz. Phenol versetzt war, nach 24-stündigem Warten nicht mehr, Meerschweinchen zu infizieren. In der Praxis dauert es nun aber mindestens 7 × 24 Stunden, ehe ein frisch gewonnenes Serum zu Heilzwecken beim Menschen angewandt werden kann.

Ich möchte dabei nicht unerwähnt lassen, daß man im Auslande die Konservierung der Sera auch vielfach in anderer Weise vornimmt. So wird z. B. im Institut Pasteur das Serum nur einer fraktionierten Sterilisierung unterzogen und dann ohne Zusatz eines Antisepticums belassen, während bei den Tavel schen Seris allein durch aseptische Entnahme und Einschmelzen des abgefüllten Serums in Glasröhrchen für die Sterilität gesorgt wird(6). An anderen Orten pflegt man auch die Sera durch Chloroform, Aether u. s. w. zu konservieren.

Das abgefüllte Serum bleibt nun in den Sammelgefäßen in trockenen Kühlkammern bei + 7° so lange stehen, bis es in den Handel gebracht bezw. amtlich in Fläschchen gefüllt werden soll.

Ueber die Haltbarkeit der mit Phenol konservierten Sera siehe S. 50 ff.

Der „lokale" Teil der amtlichen Kontrolle, welcher sich auf die sachgemäße Herstellung des Serums in der Fabrik erstreckt, liegt nicht in den Händen des Instituts, sondern ist Aufgabe der betreffenden Regierung. Diese hat durch medizinal-polizeiliche Revisionen die Serumfabrikation und die Tätigkeit des Abnahmebeamten[1]) zu kontrollieren. Letzterer hat ein Dienstbuch zu führen, aus dem ersichtlich ist:

a) die Nummern der Pferde, von denen Blut zur Herstellung des betreffenden Serums genommen ist;

b) Tag der Entnahme des Blutes, Menge desselben und Menge des erhaltenen Serums;

c) Ergebnis der Wertigkeitsbestimmung des Serums;

d) Tag der Abfüllung und der amtlichen Abnahme des Serums;

e) Tag des Abschlusses der amtlichen Prüfung und des Ergebnisses der Prüfung.

Er hat das von ihm in Klausur genommene Serum so lange in dem Stammgefäße unter Verschluß zu halten, bis die Entscheidung des Instituts über die Zulässigkeit 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 in Fläschchen abgefüllt werden. Die Fläschchen werden am Stopfen mit Papier überbunden und plombiert. Auf dem von dem Plombenverschluß gesicherten Deckpapier tragen dieselben die Kontrollnummer. Auf der einen Seite der Plombe befindet sich als

1) Dem Beamten ist Geheimhaltung der von der Fabrik besonders geübten Immunisierungsmethoden zur Pflicht gemacht.

Zeichen der amtlichen Abfüllung ein Adler (Preußen) bezw. das Hoheitszeichen des betreffenden Staates, in welchem die örtliche Kontrolle ausgeübt wird (so z. B. für Hessen ein Löwe), auf der anderen Seite die Aufschrift „Staatlich kontrolliert". Außerdem werden die Fläschchen bestimmungsgemäß mit einer Angabe über den Ort der Herstellung und die Fabrikationsstätte versehen.

Falls ein Serum die vorschriftsmäßigen Eigenschaften nicht besitzt, so erfolgt die Rückgabe an die Fabrik nur dann, wenn die Beanstandung wegen Minderwertigkeit an Immunisierungseinheiten, mangelnder Klarheit, oder sonstiger unschwer zu behebender vorschriftswidriger Eigenschaften erfolgt ist[1]). War dagegen die Beanstandung durch gesundheitsschädliche Beschaffenheit des Serums (z. B. pathogene Keime, zu hoher Phenolgehalt u. s. w.) veranlaßt, so entscheidet das Institut, 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 dagegen 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 1) die Feststellung 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, bezw. bei den für die Veterinärpraxis bestimmten Seris den erlaubten Keimgehalt von 100 Keimen pro 1 ccm Serum nicht überschreitet;

3) nicht mehr als 0,5 Proz. Phenol bezw. 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

1) Nach dieser zunächst speziell für die Prüfung des Diphtherieheilserums erlassenen Instruktion wird sinngemäß auch bei den Prüfungen der übrigen Sera verfahren.

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 (Platte), zwei Traubenzuckerbouillonröhrchen und ein Traubenzuckeragarröhrchen (hohe Schicht) mit je 5 Tropfen Serum geimpft. Die geimpften Platten und Röhrchen müssen steril bleiben, nur bei den ausschließlich für Veterinärzwecke bestimmten Seris ist, wie schon gesagt wurde, ein Keimgehalt bis zu 100 Keimen pro 1 ccm gestattet.

Weiterhin wird zur Prüfung des Phenolgehaltes einer Maus von 15 g 0,5 ccm Serum subkutan injiziert. Zeigt die Maus keine oder nur geringe Vergiftungserscheinungen, so übersteigt die Menge des zugefügten Konservierungsmittels das zulässige Maß nicht.

Bei der Prüfung der für die Anwendung beim Menschen bestimmten Seris erhält nun noch ein Meerschweinchen zur Prüfung auf Tetanustoxin bezw. etwaige vereinzelte Tetanuskeime 10 ccm Serum subkutan injiziert. Diese Prüfung erfolgt, um ähnlichen unliebsamsn Zwischenfällen, wie sie im Auslande (Amerika, Italien) vorgekommen sind (Auftreten von Tetanus nach der Injektion von Diphtherieserum), vorzubeugen. Wenn das Meerschweinchen 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 (normale), noch nicht gebrauchte Tiere zu verwenden, da die bereits zu Wertbemessungszwecken benutzten Tiere, wie dies zuerst Theobald Smith (7) beobachtete, im höchsten Grade gegen Serum überempfindlich werden.

Leider sind wir bisher nicht in der Lage, das Diphtherieserum auf seine Unschädlichkeit nach der Richtung hin zu prüfen, inwieweit ein Serum besonders geeignet ist, jene unliebsamen Nebenwirkungen hervorzurufen, welche uns als „Serumexantheme“ bekannt sind und die v. Pirquet und Schick (9, 10, 11) in neuerer Zeit als Erscheinungen spezifischer Ueberempfindlichkeit analysiert und unter dem Namen „Serumkrankheit“ zusammengefaßt haben. Es handelt sich hierbei um Hautausschläge der verschiedensten Art, die häufig mit lokalem Oedem, Gelenkschmerzen, Gelenkschwellungen, Fiebererscheinungen und sonstigen Allgemeinsymptomen einhergehen. Die Krankheitserscheinungen treten teils sofort (innerhalb 24 Stunden) oder auch erst nach einer bestimmten Inkubationszeit auf und verschwinden fast immer ohne Hinterlassung dauernder Störungen. Die durchschnittliche Häufigkeit dieser Erkrankung berechnet sich auf etwa 10 Proz. der Injizierten. Ueber ihre Ursache ließ sich bisher mit Sicherheit nachweisen, daß sie allein von dem Serum als solchem und nicht etwa durch seinen Antitoxingehalt bedingt ist, 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. Denn in diesem Falle würden gleichzeitig mit den Antitoxinen auch jene uns noch unbekannten Stoffe konzentriert werden, welche wir als die Ursache der Serumkrankheit ansehen müssen, da auch diese sicher mit den Eiweißkörpern des Serums in Zusammenhang stehen. Aus diesem Grunde kann jede Eindickung des Serums nur als ein verfehltes Verfahren zur Erreichung der bezweckten Absicht aufgefaßt werden. Das Institut ist daher beauftragt worden, alle Diphtherieheilsera auf ihren Eiweißgehalt zu untersuchen und diejenigen Sera, welche 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 Erscheinungen geringer macht und daß bei älteren abgelagerten Seris (9—12 Monate) die Serumexantheme nicht vorkommen. Inwieweit dies zutrifft, läßt sich zur Zeit noch nicht endgültig entscheiden; daß speziell die Zeit und das Erwärmen einen abschwächenden Einfluß auf die die Krankheitserscheinungen auslösende Substanz haben, muß sogar nach den vorliegenden Untersuchungen (7, 135) als sehr zweifelhaft erscheinen, da sich gezeigt hat, daß diese Substanz gerade diesen Faktoren gegenüber äußerst stabil ist.

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 (93) auf die Verkürzung der Inkubationszeit bei wiederholten Eiweißinjektionen hingewiesen hatte.

Ernstliche schädliche Nebenwirkungen, die mit Sicherheit auf die Injektion des Heilserums zurückzuführen waren, sind bei Menschen bisher äußerst selten bekannt geworden, dagegen lassen sich an den mit Diphtherieserum geheilten Meerschweinchen bestimmte Formen der „Serumüberempfindlichkeit“ bis zu den höchsten Graden leicht experimentell demonstrieren [Theobald Smithsches Phänomen (8); vergl. auch M. J. Rosenau und John F. Anderson (135)].

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 nun in jedem Falle der Besitz einer quantitativ genau arbeitenden Wertbemessungsmethode. Diese Forderung zu erfüllen, ist bisher bei einer großen Anzahl von Immunseris in völlig befriedigender Weise gelungen, wenn auch häufig erst nach Ueberwindung großer Schwierigkeiten. Besonders bedeutungsvoll für die ganze Serumtherapie ist speziell der Umstand gewesen, daß es Ehrlich (12) gelang, gerade für das Diphtherieserum eine absolut exakte Wertbemessungsmethode zu ermitteln.

Bevor auf die Faktoren, welche bei der Wertprüfung der einzelnen Sera in Betracht kommen, näher eingegangen werden kann, muß ich 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 bei solchen Bakterien erzeugt werden können, welche in unseren Nährböden Gifte sezernieren, verwendet man zur Herstellung der antibakteriellen Sera die Leibessubstanzen der Bakterien. Es läßt sich experimentell zeigen, daß ein Serum, das mit einer bestimmten Bakterienspecies gewonnen wird, direkt von der Art der Bakterienstoffe, welche zur Immunisierung verwandt werden, abhängig ist, wie dies zuerst Wassermann (13) mit Kulturen des Bacillus pyocyaneus nachgewiesen hat. 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 nun 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 derselben neutralisieren), während die antibakteriellen Sera sich im stande erweisen, die Bakterien selbst zu vernichten. In welcher Weise diese „Vernichtung“ der Bakterien geschieht, soll an anderer Stelle

näher ausgeführt werden, hier sei nur voraufgenommen, daß dieselbe bei den verschiedenen Seris jedenfalls auch auf verschiedene Weise geschehen kann (durch Bakteriolysine bezw. Opsonine, Antiaggressine u. s. w.) und daß die Schutz- und Heilwirkung dieser Sera in der Regel wohl auf dem Zusammenwirken mehrerer Faktoren beruhen dürfte.

Wenngleich gerade in der Kenntnis der Wirkungsart der Immunsera in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte gemacht worden sind, so besitzen 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 ganz auf Theorien angewiesen.

Von den zahlreichen Theorien, welche das Wesen und die Ursachen der Immunität zu erklären gesucht haben, hat nun keine eine so weitverbreitete Annahme gefunden, wie die von Ehrlich aufgestellte, sogenannte „Seitenkettentheorie“ (14, 15, 16, 99, 106, 128, 130). 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 diese auf der Fähigkeit der Zelle beruht, 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 würden nun 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 „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 nun die Zelle nach dem Weigertschen Gesetz nicht nur vollständig ersetzen, sondern vielmehr durch Ueberregeneration überkompensieren. Diese Ueberregeneration, welche 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 Antitoxine. Nach dieser Theorie, die sich für den Ausbau der Immunitätslehre so außerordentlich wertvoll erwiesen hat, haben wir uns also die Bildung der in den Seris wirksamen Stoffe (Antikörper) 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 u. s. w. gesetzten Defekt zu kompensieren. Die fundamentale Bedeutung dieser Theorie liegt darin, daß sie zwanglos alle Eigenschaften der „Antikörper“ erklärt, so in erster Linie ihre streng spezifische Wirkung und ihr Vorkommen im normalen Serum.

Bestimmte Untersuchungsbefunde haben nun 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 Arten (zweiter und dritter Ordnung), welche die Zellen befähigen, hochmolekulare Eiweißstoffe zu verankern. Zur Assimilation derartiger Stoffe ist es nach Ehrlichs Ansicht zunächst erforderlich, daß dieselben durch fermentative Prozesse abgebaut werden. Dies geschieht nun 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) haben, 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 cytophilen Gruppe sich mit der Zelle bezw. den Bakterien verbinden, während ihre zweite haptophore Gruppe (die complementophile) imstande ist, das im normalen Serum vorhandene Komplement, in dem wir später das eigentlich wirksame Prinzip bei der Lysinwirkung kennen lernen werden, an sich zu reißen.

Bezüglich, des Ortes, an dem die Antikörper entstehen, muß man nach Ehrlichs Lehre annehmen, daß alle bindungsfähigen Zellen des Organismus im stande 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 (17a, 17b), sowie von Wassermann (18), Deutsch (19) u. a. werden die bakteriolytischen Ambozeptoren z. B. im wesentlichen im Knochenmark, in der Milz und in den Lymphgefäßen erzeugt. Die Untersuchungen von Castelani (20) uud R. Kraus und Schiffmann (91) machen es andererseits wahrscheinlich, daß Präzipitine und Bakterienagglutinine in der Blutbahn gebildet werden. Weitere Untersuchungen von Römer (14) und von v. Dungern (93), sowie neuerdings speziell von A. Wassermann und Citron (44, 45) weisen darauf hin, daß unter gewissen Umständen auch an anderen Stellen eine (rein lokale) Antikörperbildung zu stande kommt.

Von der großen Reihe der verschiedenen Antikörper, (welche nach der Vorbehandlung mit Toxinen, Bakterien und sonstigen Antigenen im Tierkörper entstehen), den Präzipitinen, Antifermenten, Antitoxinen, Cytotoxinen, Agglutininen und den verschiedenen Lysinen, interessieren uns speziell die Antitoxine, welche zu den Rezeptoren erster Ordnung Ehrlichs gehören und die wirksamen Substanzen in den antitoxischen Heilseris darstellen, und die bakteriolytischen (und bakteriotropen?) Ambozeptoren, welche zu der dritten Ordnung der Rezeptoren zu rechnen sind und die Träger der spezifischen Funktion der bakteriolytischen Sera bilden.

Nach dieser Vorbemerkung über Ehrlichs Seitenkettentheorie soll nun im folgenden auf die Wertbemessung der verschiedenen, der

staatlichen Kontrolle unterstellten Sera, ihre wissenschaftlichen Grundlagen und unsere bei derselben zur Anwendung gelangenden prüfungstechnischen Maßnahmen eingegangen werden. Bezüglich der Wertbestimmung der sonstigen Heil- und Schutzsera sei auf die Arbeit von Dönitz (40) im Handbuch von Kolle-Wassermann hingewiesen. In dem genannten Handbuche finden sich auch genaue Angaben über die Immunität bei den im folgenden erwähnten Krankheiten.

a) Die Wertbemessung der Antitoxine.

Um den Wirkungswert eines antitoxischen Serums zu definieren, messen wir seinen Gehalt an Antitoxinen. Allerdings wären, wie auch schon Behring (21) betont hat, für die vollständige Wertbemessung eines Serums 4 Versuchsreihen anzustellen, welche folgende Fragen zu entscheiden hätten:

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

Allein zahlreiche Versuche haben nach v. Behring ergeben, daß ein stabiles Verhältnis zwischen diesen vier Werten besteht, so daß, wenn wir einen derselben genau kennen, auf die anderen drei Rückschlüsse gemacht werden können. Nachdem dann aber Roux (22) behauptet hatte, daß nach bestimmten Beobachtungen eine Parallele zwischen dem antitoxischen Wert eines Serums und seinem präventiven und kurativen Wert nicht bestehe, daß vielmehr unter Umständen hochwertige Sera weit geringere heilende und schützende Eigenschaften besäßen als solche mit geringerem Gehalt an Immunitätseinheiten, hat Marx (23) im hiesigen Institut diese Frage eingehend untersucht. Auf Grund umfangreicher experimenteller Untersuchungen über die Beziehung zwischen dem Gehalt an Immunitätseinheiten und dem schützenden und heilenden Wert der Diphtheriesera kam aber auch Marx zu dem Ergebnis, daß die toxin-neutralisierende Kraft eines Diphtherieheilserums, d. h. der Gehalt desselben an Antitoxineinheiten und die immunisierende und heilende Wirkung drei Faktoren sind, die in engster Beziehung stehen, und zwar in der Weise, daß der Immunisierungs- und Heileffekt eines Serums dem Gehalt an Immunitätseinheiten direkt proportional ist. Wir sind also hiernach berechtigt, die Wertbemessung der antitoxischen Sera allein durch Feststellung ihres Gehaltes an Immunitätseinheiten vorzunehmen und nicht gezwungen, den Anschauungen Roux' entsprechend den präventiven und kurativen Effekt der Heilsera besonders zu bestimmen, eine Forderung, durch welche die Wertbemessung, wie dies an späterer Stelle ausdrücklich auseinandergesetzt werden wird, nicht unerheblich kompliziert und erschwert werden würde.

Zur Wertbemessung eines antitoxischen Serums genügt es also allein, dessen Gehalt an Antitoxinen zu ermitteln. Diese Ermittelung begegnet nun beim Diphtherieserum und beim Tetanusserum keinerlei Schwierigkeiten, nachdem wir seit den grundlegenden Arbeiten Ehrlichs (12, 24, 25) genaue Kenntnis über die Konstitution der Gifte und über die Beziehungen zwischen Toxin und Antitoxin besitzen.

Gegenüber den verschiedenartigsten Anschauungen über die Bindung zwischen Toxin und Antitoxin vertraten Ehrlich und v. Behring bereits von vornherein den Standpunkt, daß zwischen beiden Komponenten eine direkte chemische Beziehung bestände. Speziell Ehrlich (3) konnte bei seinen Untersuchungen über die Beziehungen des Ricins zum Antiricin durch Einführung des Reagenzglasversuches zeigen, daß Gift und Gegengift sich direkt chemisch vereinigen müssen, ohne Mitwirkung vitaler Kräfte. Spätere Untersuchungen, u. a. besonders von Martin und Cherry (27), Wassermann und Bruck (28, 95) haben in vitro und in vivo die von Ehrlich ersterkannte chemische Natur dieser Bindung experimentell bewiesen, und heute kann dieselbe als sichergestellt gelten [vergl. auch L. Michaelis (134) u. Levaditi (94)]. Man hat sich jedoch die Entgiftung des Toxins nicht als eine Zerstörung desselben vorzustellen, sondern man muß annehmen, daß bei der Bindung Toxin-Antitoxin eine neue und ungiftige Verbindung entsteht.

Die von Ehrlich gefundenen Tatsachen führten ihn zu folgenden Schlüssen:

Das Toxinmolekül besitzt zwei funktionell verschiedene Atomkomplexe, eine die Giftwirkung verursachende labile (toxophore) und eine die Bindung an das Antitoxin bewirkende stabilere (haptophore) Gruppe; das Antitoxin wirkt spezifisch und direkt auf das Toxin ein; die Bindung zwischen beiden Komponenten erfolgt nach dem Gesetz der Multipla als chemische Reaktion; gewisse scheinbare Ausnahmen von diesem Gesetz werden durch die komplexe Konstitution der Gifte erklärt.

Es würde wohl zu weit führen, die Wirkung der einzelnen Faktoren, welche bei der chemischen Natur der Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin für den Ablauf dieser Reaktion besonders wichtig sind, eingehend zu besprechen. Es kann hier nur hervorgehoben werden, daß außer der Reaktionszeit besonders die Temperatur, die Konzentration der Lösungen und der Salzgehalt der Medien, in denen die Reaktion vor sich geht, bei diesem Neutralisierungsvorgang von höchster Bedeutung sind, und daß daher ihr Einfluß bei der Beurteilung dieses Vorganges stets berücksichtigt werden muß [Ehrlich (12), v. Behring (26), Knorr (119), Behring und Ransom (8)].

Neuere Untersuchungen [Morgenroth (29), Otto und Sachs (30)] haben es weiter wahrscheinlich gemacht, daß man bei Vereinigung zwischen Toxin und Antitoxin auch mit katalytischen Einflüssen (in

dem Subkutangewebe bezw. dem Serum selbst) wird rechnen müssen, worauf bereits v. Behring (31) hingewiesen hat.

Kommt es nun darauf an, die antitoxische Wirkungskraft, d. h. den Gehalt eines Serums an Antitoxinen zu messen, so bedarf es hierzu natürlich in erster Linie eines bestimmten, auf unbegrenzte Zeiten hin konstant zu erhaltenden Maßstabes. Hierzu dient die „Immunitätseinheit“ (Antitoxineinheit). Die Entstehung der Definition dieser Einheit ist ursprünglich auf den von v. Behring (26, 32, 42), formulierten Begriff des „Tetanusnormalserums“ zurückzuführen.

„1 ccm Tetanusnormalserum sollte den zur Erreichung eines Heileffektes bei weißen Mäusen erforderlichen Mindestgehalt an Antitoxin enthalten.“ Als sich später aber zeigte, daß dieser Heileffekt von vielen unkontrollierbaren Faktoren abhing und daher als genauer Maßstab nicht brauchbar war, wurde zwar der „Mischungsversuch“ an Stelle der alten Methode gesetzt, aber den weiteren Berechnungen des Antitoxinwerts das ursprüngliche Normalserum bezw. ein mit diesem Serum eingestelltes bestimmtes Gift zu Grunde gelegt und 1 ccm Tet.AN^{1} = 1 A.I. gesetzt. In ähnlicher Weise entstand das „Diphtherieserum“. Später wurde dann als Diphtherienormalserum von Ehrlich und Behring (40) ein Blutserum bezeichnet, von dem 0,1 ccm genau 1 ccm Normalgift, also 100 tödliche Dosen[1]), neutralisierte. 1 ccm des Normalserums, enthielt die allen Wertmessungen zu Grunde gelegte Maßeinheit, „eine Immunitätseinheit“ (Ehrlich).

Die jetzt in der Prüfungstechnik gebrauchten Maß-(Immunitäts-)Einheiten sind dagegen willkürlich gewählte Größen und für das Diphtherieserum z. B. so entstanden, daß Ehrlich eine bestimmte Menge Antitoxin als Einheit bezeichnete, welche von einem damals zur Verfügung stehenden Gift 100 D.L. so absättigte, daß nach Injektion dieses Gemisches auch nicht die geringste Spur von Krankheit (lokaler und allgemeiner Reaktion) eintrat. Als Träger dieser Einheit wählte er das Antitoxin, nachdem sich einerseits bei der Diphtherieprüfung ergeben hatte, daß die Diphtheriegifte hierzu nicht geeignet waren, weil sie, selbst wenn man sie sorgfältig vor äußeren Schädlichkeiten schützte, sich dennoch allmählich abschwächten, und es ihm andererseits gelungen war, eine absolut sichere Serumkonservierungsmethode zu finden. Das erste zu Standardzwecken verwandte

1) Beim Diphtheriegift war diejenige Menge Gift als einfache tödliche Dosis bezeichnet worden, die ausreichte, um ein Meerschweinchen von 250 g akut in 4—5 Tagen zu töten (Ehrlichs physiolog. Gifteinheit). v. Behring hatte weiter dann dasjenige Gift als „Normalgift“ angenommen, welches in 1 ccm genau 100 einfach tödlichen Dosen enthielt (D.T.N.^{1}M^{250} = Diphtherietoxin 1-fach normal, geprüft an Meerschweinchen von 250 g).

Serum, welches als Diphtherie-Urstandard im Frankfurter Institut ähnlich wie das Metermaß in Paris aufbewahrt wird, ist z. B. ein seinerzeit evakuiertes Diphtherietrockenantitoxin von 1700-facher Stärke. Da nun der Maßstab, wenn er verloren ginge, unersetzlich wäre und die absolute Konstanthaltung Grundbedingung einer exakten Wertbemessung ist, so liegt natürlich eine der Hauptaufgaben der amtlichen Prüfungsstelle darin, mit allen zu Gebote stehenden Mitteln für die absolute Unveränderlichkeit der Maßstäbe Sorge zu tragen.

Die Bedeutung eines absolut unveränderlichen Maßstabes für die Wertbemessung haben besonders die früheren Erfahrungen mit dem Diphtherieheilserum gelehrt (12, 33). Bekanntlich gab es in den ersten Jahren der Heilserumtherapie eine Zeit, wo dieselbe bei der Diphtherie, besonders in England, stark in Mißkredit geraten war, da die Wirkung der dort zur Anwendung gelangenden Heilsera sich als unzuverlässig erwies. Eine von der englischen Zeitschrift „The Lancet“ eingesetzte Kommission konnte damals aber nachweisen, daß dieses Versagen der Sera allein darauf zurückzuführen war, daß die zur Anwendung gelangenden Sera ungenügend antitoxinhaltig waren. Als diese Kommission nämlich unter Benutzung der ihr vom Steglitzer Institut für Serumforschung und Serumprüfung gelieferten Prüfungsmaterialien die englischen Sera nachprüfte, fand sie, daß dieselben zum Teil kaum den sechsten Teil des angegebenen Wertes besaßen, während die in Deutschland von Schering bezw. den Höchster Farbwerken hergestellten Sera vollwertig waren. Zu einem ähnlichen Resultat gelangte Madsen in Kopenhagen, als er ein in Dänemark vielfach zur Anwendung gelangtes Serum untersuchte. Er fand dabei, daß diesen für therapeutische Zwecke viel zu schwach war. Dieses Vorkommen zu schwacher Sera war nur so zu erklären, daß die in England und Dänemark früher angewandten Maßstäbe sich abgeschwächt hatten. Daß damals das Steglitzer Institut vor ähnlichen Unannehmlichkeiten bewahrt blieb, verdankte es allein den sorgfältigen Nachprüfungen, welche Ehrlich mit dem Testgift und Serum vornahm. Dabei fand er die außerordentlich wichtige Tatsache, daß beide Komponenten durchaus harmonisch absinken und so ein Konstantbleiben vortäuschen konnten. Diese Erfahrungen, einmal, daß auch die glyzerinhaltigen Antitoxinlösungen eine Abschwächung erfahren können und zweitens, daß die Konstanz des Neutralisationspunktes eine sichere Garantie für die Konstanz der Testlösungen nicht bietet, veranlaßten seiner Zeit Ehrlich, andere Konservierungsmethoden zu suchen, die eine sichere Haltbarkeit garantierten. Dabei galt es besonders, diejenigen Faktoren auszuschließen, welche nach chemischen Erfahrungen die Zerstörung derart zersetzlicher Körper bedingen: Wasser, Sauerstoff, Licht und Wärme.

Die Maßnahmen, welche nun unter Berücksichtigung dieser Faktoren zur Konstanthaltung der Sera in der Prüfungstechnik nach dem Vorgange Ehrlichs beim Diphtherieserum allgemein eingeführt sind, bestehen in der Konservierung der Sera in Ehrlichschen Vakuumapparaten (12, 35, 36) und späterer geeigneter Aufbewahrung dieser Apparate. Diese Methode der Serumkonservierung eignet sich ebenso vorzüglich zur Konservierung größerer Mengen trockenen

Serums (Diphtherie-Standard) wie zu der kleinster Serumdosen, (z. B. Tetanus-Standardserum, von welchem in jedem Vakuumapparat nur 0,006 g Serum enthalten sind). Die Methode eignet sich ferner auch zur Konservierung von Giften. Praktische Momente sprechen aber, wenigstens bei der Diphtherieprüfung, für die Anwendung dieses Verfahrens allein beim Antitoxin.

Die Ehrlichsche Serumkonservierungsmethode ist kurz folgende: Die zu konservierenden Sera werden, falls es sich um flüssige Präparate handelt, mit feinsten Pipetten bezw. Büretten in Serumröhrchen von bestimmter Form (s. Fig. 2a) eingefüllt. (Es dürfen nur völlig native Sera ohne irgend welchen Zusatz benutzt werden. Handelt es sich um die Konservierung von größeren Dosen Trockenserum, so müssen

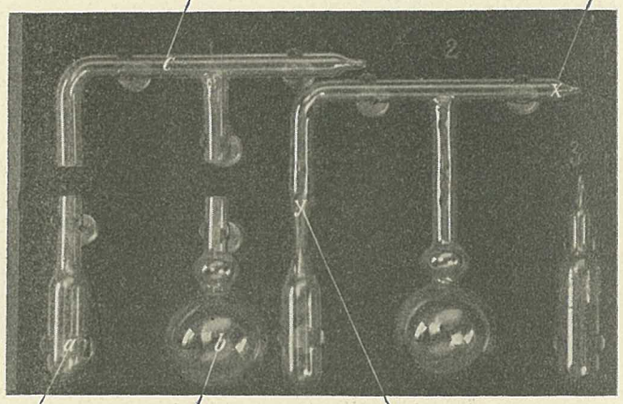


Fig. 2.

die einzelnen Dosen auf der chemischen Wage genau abgewogen werden). Diese Serumröhrchen „*a*“ bilden nun den Teil eines Röhrensystems (Fig. 2), zu dem noch ein Kölbchen „*b*“, das zur Aufnahme von Phosphorsäureanhydrid dienen soll, und ein Verbindestück „*c*“ gehört. Nachdem das trockene Serum eingefüllt ist, bezw. nachdem das in die Serumröhrchen eingefüllte flüssige Serum im Exsikkator über Nacht vorgetrocknet ist, werden die einzelnen Stücke des Röhrensystems in der aus obiger Figur ersichtlichen Anordnung aneinander geschmolzen und zur weiteren vollständigen Evakuierung eine Anzahl solcher Apparate mit einer Quecksilber-Luftpumpe in Verbindung gebracht (s. Fig. 3).

Unter dem Einfluß des Vakuums wird nun das Wasser, welches noch bis zu 10 Proz. in den Trockenseris enthalten ist, schnell durch das Phosphorsäureanhydrid absorbiert und zugleich mit dem Sauerstoff entfernt. Nachdem die Röhrchen dann bei *x* (Fig. 2) abgeschmolzen

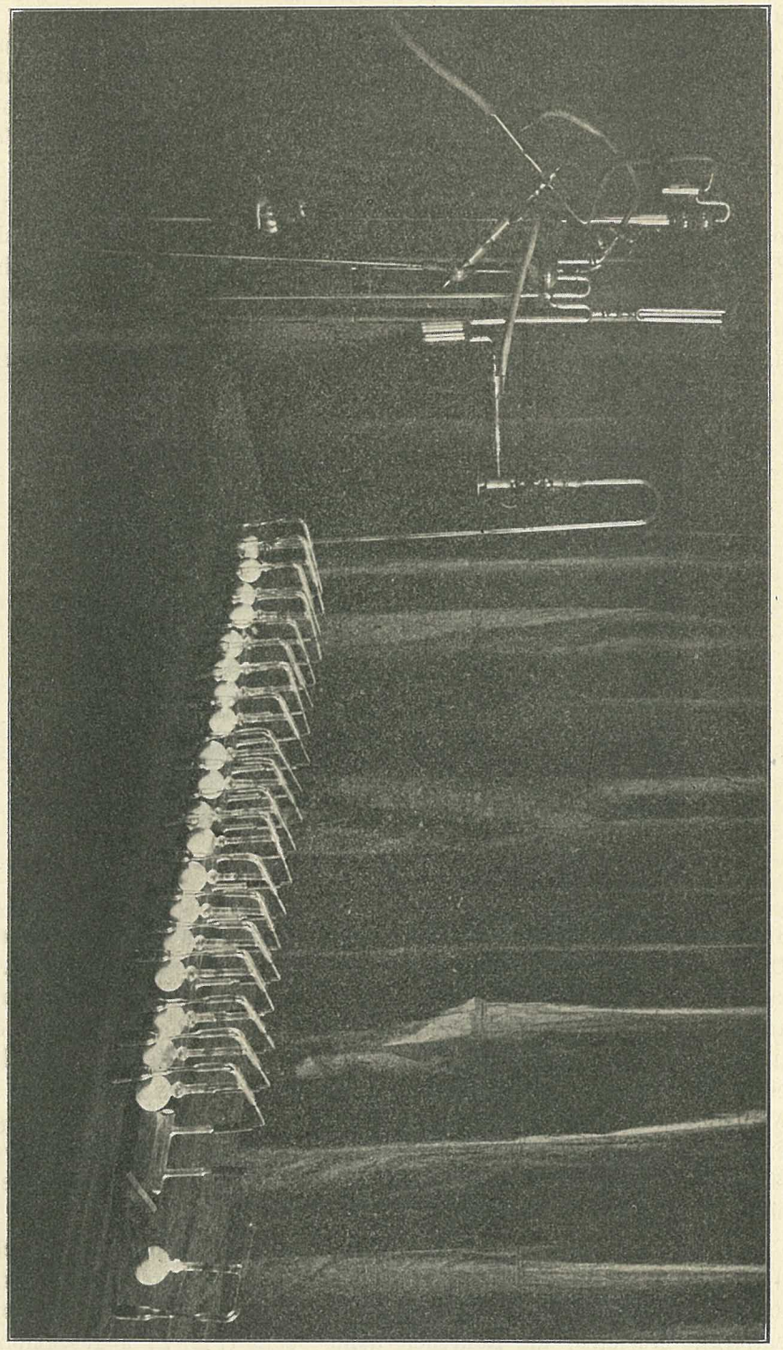


Fig. 3.

sind, bleiben sie noch längere Zeit unter dem Einfluß des Phosphorsäureanhydrids stehen, bis dieses sichtbar keine Feuchtigkeit mehr aufnimmt. (Prüfung: Das durch Klopfen vorsichtig aufgeschüttelte Anhydrid muß unverändert bleiben.) Alsdann werden die das Serum enthaltenden Teilchen des Apparates bei *y* abgeschmolzen, und 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, vermag sich das Serum so jahrelang unverändert zu halten. Es ist jedoch nicht vorteilhaft, wie ich auf Grund im hiesigen Institut angestellter Versuche (35) bemerken möchte, die Absorption des Wassers bei erhöhter Temperatur forcieren zu wollen, vielmehr scheint hierzu die geeignete Temperatur die Zimmertemperatur zu sein.

Von der gleichen praktischen Wichtigkeit wie die Konservierung ist natürlich auch die absolut genaue Fortführung der Maßeinheit bei der Einstellung eines neuen Standardserums, falls 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 wird daher bei der Herstellung eines neuen Standardserums am besten in folgender Weise verfahren. Angenommen, es handle sich um die Neueinstellung eines frischen Diphtheriestandardserums [1]). Nachdem man sich durch Vorprüfungen von dem ungefähren Werte des Serums überzeugt hat, werden bestimmte abgewogene Mengen Trockenserum in die Standardapparate eingefüllt und evakuiert. Aber erst nachdem das Serum einige Zeit gelagert hat, beginnt man mit der genauen Einstellung des Serums (vergl. auch den folgenden Abschnitt „Testgifte"). Zu diesem Zwecke werden die benötigten fertigen Röhrchen wieder geöffnet und der Inhalt eines Röhrchens in einer ganz bestimmten Flüssigkeitsmenge gelöst. Mit diesem frisch gelösten Serum wird nun zunächst der ungefähre Wert des Serums ermittelt (Tabelle 2), nachdem man sich zuvor von der Konstanz der Prüfungsdosis des Testgiftes überzeugt hat (Tabelle 1). Ist beides geschehen, so erfolgt die genaue Einstellung des Serums in der Weise, daß man die in Betracht kommenden Verdünnungen des Serums gegen dieselben fallenden Dosen Gift prüft, mit welchen man 1 I.E. des alten Standardserums eingestellt hatte (Tabelle 3). Auf

1) Vergl. hierzu S. 39 ff.

diese Weise ist eine absolut genaue Ermittlung des Wertes eines Serums möglich, wie das folgende Beispiel zeigt:

Tabelle No. 1. Kontrolle der Prüfungsdosis.

Giftmenge in ccm	Altes Standardserum	Urstandard					
		Versuch am:					
	4. XI. 1902	4. XI. 1902	7. XI. 1902	11. XI. 1902	14. XI. 1902	18. XI. 1902	21. XI. 1902
0,76	davon	davon	davon	davon	davon	davon	davon
0,77	davon	davon	davon	davon	davon	† 4	davon
0,78	† 4[1])	† 4	† 4	† 4	davon	† 3	† 4
0,79	† 3½	† 3½	† 3	† 4	† 4	† 3	† 3

Tabelle No. 2. Orientierende Einstellung des neuen Standardserums mit der Prüfungsdosis 0,78.

Bei Verdünnung d. Serums auf ?-fach	Versuch am:								
	11. XI. 1902	14. XI. 1902	18. XI. 1902	26. XI. 1902	29. XI. 1902	3. XII. 1902	5. XII. 1902	8. XII. 1902	15. XII. 1902
12,0	davon	—	davon	davon	—	—	—	—	—
12,25	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12,5	—	davon	davon	davon	davon	davon	—	—	—
12,75	—	—	—	—	† 4½	davon	davon	davon	† 5
13,0	† 5	† 5	† 4	davon	† 4	† 4	davon	davon	† 4½
13,25	—	—	—	—	† 3	† 3	† 5	† 4	† 4
13,5	—	† 3	† 4	† 3	† 3	—	—	† 3	† 4
13,75	—	—	—	—	—	—	—	—	† 3
14,0	† 3	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle No. 3. Genaue Einstellung des neuen Standardserums.

Giftmenge in ccm	Am 15. XII. 1902 als 13,0fach	Am 15. XII. 1902 als 13,25fach	Am 15. II. 1903 als 13,25fach	Am 15. II. 1903 als 13,5fach
0,76	davon	davon	davon	—
0,77	davon	davon	davon	† 4
0,78	davon	† 4	† 4	† 4
0,79	davon	† 4	† 3	† 3

Erklärung zu Tabelle 1—3.

Tabelle 1 zeigt, daß auf Grund der mit dem alten Standard und dem Urstandard angestellten Versuche die L†-(Prüfungs-)Dosis des Giftes = 0,78 ccm ist.

Aus Tabelle 2 ergibt sich, daß unter Benutzung der gefundenen Prüfungsdosis (= 0,78 ccm) das neue Serum = 13,25fach, eventuell aber noch als 13,0- bezw. 13,5fach anzusehen ist.

Nach Ausfall der Versuche in Tabelle 3 und Vergleich mit den Versuchen in Tabelle 1 ist das neue Serum in der Tat genau 13,25fach.

Für die praktische Ausführung der Prüfung ist also als tertium comparationis noch ein Gift notwendig. Theoretisch kann man mit irgend einem beliebigen Gift, wie es zur Verwendung kommt, im einzelnen Falle eine Messung eines derartigen Serums vornehmen und seinen Gehalt an Antitoxineinheiten feststellen, indem man (wie oben gezeigt wurde) einer-

1) † 4 = tot am 4. Tage.

seits die Standardeinheit in successiven Reihen mit steigenden Giftdosen versetzt und andererseits beliebige Verdünnungen des betreffenden Probeserums in dieser Weise behandelt. Der Vergleich dieser Reihen erlaubt dann ohne weiteres eine Wertbestimmung. Natürlich ist ein solcher Modus im allgemeinen höchst unbequem, indem für die Ermittlung jedes Serums eine große Tierreihe notwendig wird, und daher nur in ganz besonderen Fällen (siehe S. 31 ff.) anwendbar. In der Praxis hat sich ein anderer Weg bewährt. Derselbe beruht darauf, daß es möglich ist, Gifte eine gewisse Zeit in ihren prüfungstechnischen Eigenschaften konstant zu halten. Beim Diphtheriegift ist dies einfach in der Konservierung in der gewöhnlichen Form möglich, sobald die Gifte „abgelagert" sind, beim Tetanusgift ist eine Konservierung nur im trockenen Zustande möglich. Solche Gifte von prüfungstechnischer Konstanz werden als Standardgifte bezeichnet. Bei ihnen genügt es, ein einziges Mal genaue Tierserien vorzunehmen, deren Endzweck es ist, zwei Giftdosen [Ehrlich (12)] zu ermitteln, 1) diejenige Dosis, die von der betreffenden Antitoxindosis so abgesättigt ist, daß sie überhaupt keine Giftwirkung mehr erkennen läßt, L_0-Dosis, und 2) diejenige Giftmenge, die so verändert ist, daß von den in dem Gifte enthaltenen vielfachen tödlichen Giftdosen nur eine einzige Dosis letalis übrig geblieben ist (L†-Dosis).

Jede von diesen beiden Giftdosen kann als Prüfungsdosis gelten. So war z. B. ursprünglich beim Diphtheriegift die Prüfungsdosis der L_0-Wert, während bei der jetzigen Prüfungsmethode auf den L†-Wert eingestellt wird.

Ist die Prüfungsdosis, z. B. die L†-Dosis, bei einem solchen Gifte einmal festgelegt, so hält sich dieselbe in der Regel sehr viele Monate lang unverändert, wie die folgende Tabelle No. 4 zeigt. Diese Tabelle enthält eine Zusammenstellung aller bisherigen Diphtherietestgifte mit Angabe der Prüfungsdosen. Im ganzen wurden seit 1897, d. h. seit der Einführung der neuen Ehrlichschen Prüfungsmethode, 9 Gifte als „Prüfungsgifte" benutzt. Die Prüfungsdosis (L†-Dosis) schwankte bei den einzelnen Giften zwischen 0,26 und 0,79 ccm. Die Tabelle zeigt nun, wie gesagt, daß sich die einmal ermittelte Prüfungsdosis meist recht lange unverändert zu halten pflegt, so war sie z. B. bei dem Gift 2, welches im ganzen 12 Monate als Prüfungsgift verwandt wurde, unverändert = 0,5 ccm. Aus der Tabelle ist aber noch ersichtlich, daß man in einzelnen Fällen (Gift 1, 4, 7 u. 8) 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. Bemerkenswert ist immerhin, daß sich dann nach dieser Zeit alle Gifte weiterhin so lange unverändert hielten, als sie in Gebrauch waren, das war bei dreien 1 Jahr und darüber.

Wenn man nun den L_0- bezw. L†-Wert eines Giftes gewonnen hat,

Tabelle No. 4.

Testgift No.	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	Seit September 1905	—	—	0,27 „	bisher 10

so ist die Bestimmung des antitoxischen Wertes eines Serums, z. B. eines Diphtherieserums, höchst einfach, zumal es sich bei der Prüfungsaufgabe des Instituts nur darum handelt, einen bestimmten Wertgehalt zu garantieren. Soll z. B. ein Serum 500-fach sein, so muß in jedem Kubikcentimeter der Verdünnung 1 : 500 eine Antitoxineinheit enthalten sein. Mischt man also 1 ccm der Verdünnung 1 : 500 mit der auf eine Immunitätseinheit bezogenen L_0-Dosis, so darf das Tier, wenn das Serum genau 500fach ist, keine lokalen Erscheinungen zeigen (d. h. es muß am 4. Tage „glatt" sein). Ist aber weniger als eine Immunitätseinheit in der berechneten Serumdosis enthalten, also das Serum nicht 500-fach, so muß eine Induration eintreten. Aehnlich verhält es sich bei der Prüfung mit der L†-Dosis. Wird z. B. ein zu prüfendes Serum mit der L†-Dosis gemischt, so sind 4 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 genauen Wert, 3) das Tier stirbt am 4. Tage, d. h. das Serum besitzt gerade den angegebenen Wert, oder 4) das Tier stirbt innerhalb der ersten 3 Tage, d. h. das Serum ist unterwertig. In der Prüfungspraxis verlangen wir nun — wie hier vorausgenommen werden mag — daß ein zur Prüfung gestelltes Diphtherieserum aus bestimmten Gründen (siehe S. 45) nicht nur den absolut genauen Wert besitzt, sondern höherwertig ist und statt den sub 3) genannten Bedingungen mindestens den sub 2) angeführten Anforderungen entspricht.

Hat man nun absolut konstante Maßstäbe zur Verfügung, so bedarf es noch eines Indikators, der anzeigt, inwieweit die Neutralisierung zwischen einem gegebenen Antitoxin und einem bestimmten Toxin erfolgt ist, da eine bestimmte Serumdosis stets nur eine bestimmte Menge Gift bindet. Hierzu bedienen wir uns des Tierkörpers, und zwar kommt es darauf an, eine Tierspecies von genügend gleichmäßiger Empfänglichkeit bezw. Resistenz zu besitzen. Denn nur wenn diese Bedingung erfüllt ist, ist eine genaue Messung möglich. Dies ist nicht bei allen Giften der Fall. Ein typisches Beispiel hierfür bietet das Crotin (Ehrlich).

Gegenüber diesem Gifte finden sich bei den Tieren alle möglichen Differenzen insofern, als das eine Tier unempfindlich und das andere

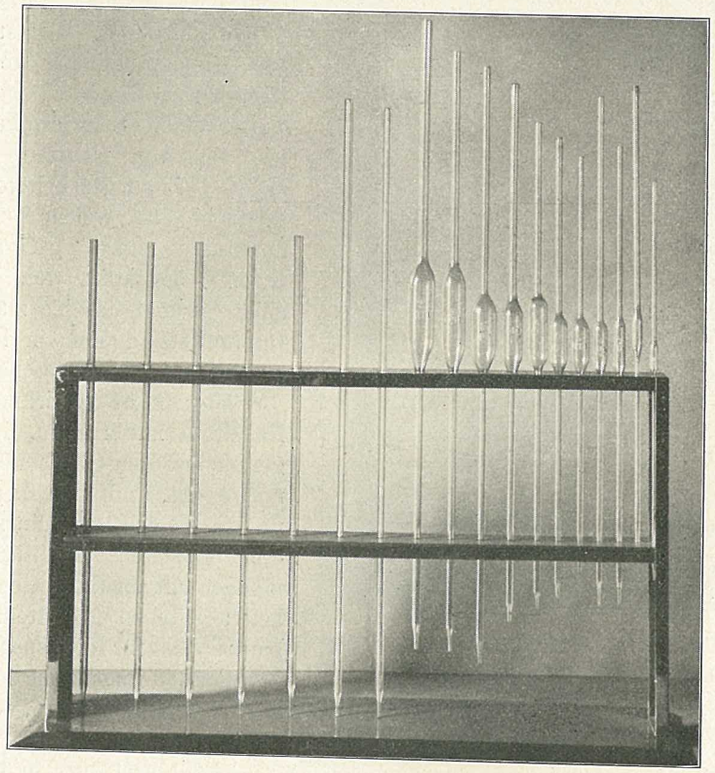


Fig. 4.

hoch empfindlich ist. Wendet man z. B. ein Gemisch von Crotin und Anticrotin an, das nicht vollkommen gesättigt ist, so kann dies bei unempfindlichen Tieren doch als gesättigt erscheinen. Es ist also Voraussetzung der Messung der Wirksamkeit eines antitoxischen Serums, daß man Tiere von gleichmäßiger Empfindlichkeit zu Gebote hat, die nicht solche Schwankungen zeigen. Dies ist nun bei den der staatlichen Prüfung unterstellten Seris der Fall, insofern als wir im Meerschweinchen für das Diphtheriegift und in der Maus (und dem Kaninchen) für das Tetanusgift Tiere von hoher gleichmäßiger Empfänglichkeit besitzen.

Sind diese Hauptbedingungen für die Wertbestimmung eines antitoxischen Serums erfüllt, so ist dessen quantitative Wertmessung mit größter Genauigkeit möglich, wie dies z. B. die von Ehrlich ausgearbeitete Prüfungsmethode für das Diphtheriegift zeigt, welche mit einer Fehlergrenze von höchstens 2 Proz. arbeitet. Selbst die Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxin begegnet dann keinen Schwierigkeiten, wie eine von Ehrlich und Marx (37) ausgearbeitete Methode beweist, welche bei Benutzung eines geeigneten Giftes[1]) gestattet, den Wert eines Serums, das bis zu $^1/_{240}$ Immunitätseinheiten in 1 ccm enthält, exakt festzustellen.

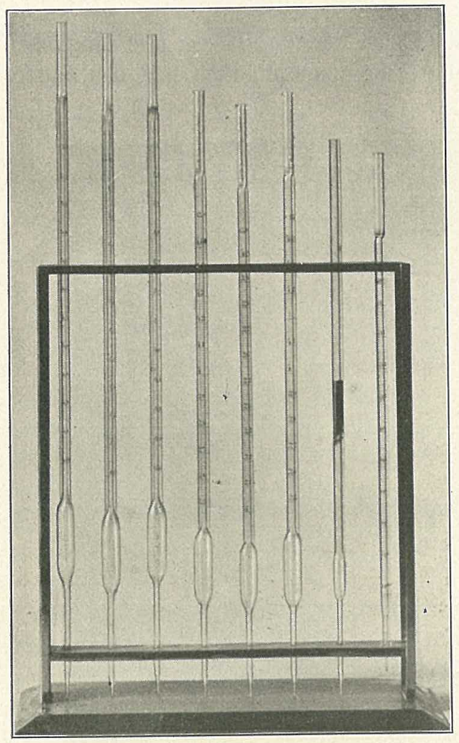


Fig. 5.

Um stets gleichmäßige Resultate zu erzielen, ist es gerade bei der Giftabmessung notwendig, mit Meßapparaten zu arbeiten, die selbst die kleinsten Flüssigkeitsmengen mit absoluter Genauigkeit abzuteilen gestatten. Es sind daher für die speziellen Zwecke der staatlichen Serumprüfung bestimmte Pipetten von Ehrlich eingeführt worden, welche teils auf Inhalt, teils auf Ausfluß geeicht sind und als „Voll"- bezw. „Feinpipetten" von der Firma F. & M. Lautenschläger in Berlin

1) Diese Methode benutzt als Indikator die ödemmachende Wirkung des Diphtheriegiftes; es handelt sich dabei darum, diejenige Menge Antitoxin festzustellen, welche genügt, um die geringste noch deutlich ödemmachende Dosis völlig oder gar nicht mehr sichtbar zu beeinflussen. Die mehr oder weniger große Feinheit des Nachweises ist daher von der Konstitution des Diphtheriegiftes abhängig! Gegen diese Methode, welche naturgemäß weniger für die Prüfungspraxis als für wissenschaftliche Untersuchungen bestimmt ist [sie wurde z. B. von Salge (137) zum Nachweis kleinster Mengen Antitoxin im Blute von Säuglingen, die mit Ammenmilch Diphtherieantitoxin stomachal eingeführt erhielten, sehr erfolgreich verwandt], sind von einigen Seiten theoretische Einwände (139) erhoben worden, die aber bei der Nachprüfung sich nicht als stichhaltig erwiesen haben [Uffenheimer (138)].

in den Handel gebracht werden. Die „Feinpipetten" sind auf $^1/_{100}$ ccm geeicht und werden von uns in folgenden Sätzen vorrätig gehalten:

0,7—2,0 ccm	3,5—4,5 ccm
1,5—3,0 „	4,0—5,0 „
3,0—4,0 „	und 4,5—5,5 „

Diese Pipetten (und auch wohl die bekannten „Stangen") werden bei Versuchen zur Ermittelung der Giftigkeit eines Toxins und des Absättigungsverhältnisses zwischen Toxin und Antitoxin speziell zur Abmessung des Toxins benutzt. Bei der Abmessung der Serumverdünnungen, speziell des Diphtheriestandardserums, bedienen wir uns dagegen der sogenannten „Vollpipetten", d. h. auf Inhalt geeichter Pipetten. Die gewöhnlichen Ausflußpipetten sind für diese Zwecke unbrauchbar, da besonders das infolge seines hohen Glyceringehaltes dickflüssige Standardserum an den Wandungen der Pipette nicht unerhebliche Serummengen zurückläßt. Bei den Vollpipetten kann man indessen nach Ausfluß des Serums mit der Lösungsflüssigkeit die Pipette sorgsam ausspülen. Wir besitzen außer auf 1 ccm geeichten Vollpipetten noch folgende Größen, welche zur Abmessung der Verdünnungsflüssigkeit benutzt werden: Pipetten geeicht auf 2, 3, 4, 5, 6, 7—10, 17—20, 27—30, 38—40, 48—50, 59, 69, 79, 99—100.

Das Füllen der Pipetten nehmen wir stets in der Weise vor, daß wir an dem oberen Ende direkt mit dem Munde saugen. Da dieses Verfahren und auch das Verschließen der Pipette durch Aufsatz mit dem Finger bei infektiösen Flüssigkeiten nicht ungefährlich sein kann, so hat man versucht, das Saugen mit dem Munde durch eine andere Saugvorrichtung (z. B. Gummiballon, Aspirationsspritze, Quetschhahn) zu ersetzen. Allein alle derartigen Aufsätze sind wenig praktisch. Eine rühmliche Ausnahme scheint dagegen eine neue von Küster (38) konstruierte Saugvorrichtung zu machen, welche mit Hilfe eines luftdicht zu befestigenden Pipettenaufsatzes eine genaue (bis $^1/_{1000}$ ccm) und rasche Abmessung kleinster Flüssigkeitsmengen gestattet. Das sichere Funktionieren des Apparates beruht auf einem steilen Schraubengewinde, durch welches der Gang des Saugkolbens geregelt wird.

Erwähnt sei noch, daß wir alle Mischungen von Gift + Serum in kleinen Fläschchen (aus dunklem Glase) vornehmen und uns zu diesem Zweck die verschiedensten Größen (sterilisiert) vorrätig halten. Aus diesen Fläschchen entnehmen wir bei kleinen Mengen (z. B. der Tetanusprüfung) mittelst der graduierten Injektionsspritzen das zu injizierende Quantum, bei größeren Mengen Flüssigkeit, z. B. bei der Diphtherieserumprüfung, gießen wir die Gemische zur Injektion in die geöffnete Kochsche Spritze und spülen das Fläschchen sorgfältig mit Kochsalzlösung nach. Um jedes Umgießen von abgemessenen Mengen zu vermeiden, verfährt Rosenau (39) in der Weise, daß er die Mischungen in der Spritze selbst vornimmt und zu diesem Zwecke sich eine Batterie Spritzen vorrätig hält, wie es Fig. 6 zeigt.

Im einzelnen erfolgen nun die Prüfungen der beiden staatlich kontrollierten antitoxischen Sera in folgender Weise:

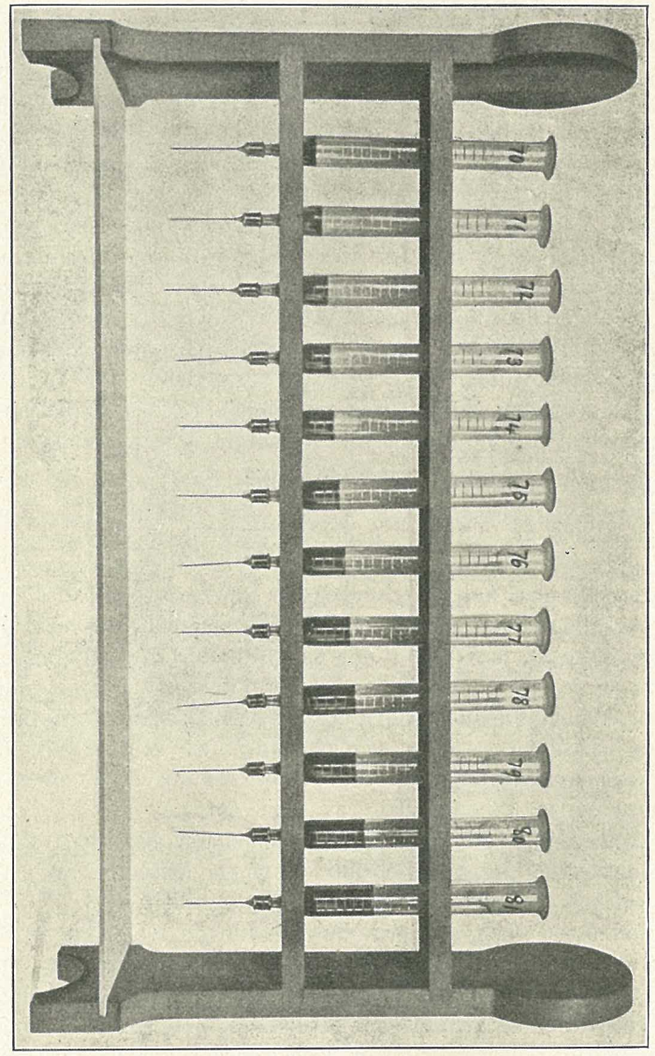


Fig. 6.

1. Die Prüfung des Diphtherieheilserums.

Die amtliche Prüfung des Diphtherieheilserums im Institut wird bestimmungsgemäß stets von zwei Institutsmitgliedern getrennt ausgeführt. Stimmen die Prüfungen beider Beamten nicht überein, so muß die Prüfung von beiden wiederholt werden. Bei nochmaliger Differenz ist die Untersuchung in Gegenwart des Direktors des Institutes für experimentelle Therapie zu wiederholen. Bei Uebereinstimmung der Prüfung wird von beiden Beamten der Zulassungsschein ausgestellt und an die Fabrik gesandt. Die Prüfung selbst besteht in der Feststellung

1) der Unschädlichkeit und
2) des Wirkungswertes des zu prüfenden Serums.

Die zu diesem Zwecke angestellten Sterilitätsproben und geimpften Tiere werden 6 Tage lang beobachtet. Ein Teil der zur Untersuchung eingesandten Fläschchen wird zu den später noch zu besprechenden, offiziellen Nachprüfungen aufbewahrt. Bezüglich der Prüfung auf „Unschädlichkeit“ sei auf S. 19 hingewiesen.

Die Wertbestimmung, zweifellos der wichtigste Akt der amtlichen Serumprüfung, erfolgt in der Weise, daß nach der von Ehrlich eingeführten Wertbemessungsmethode (12) das Serum auf seinen Antitoxingehalt geprüft wird.

Ursprünglich ging man bei der Wertbemessung des Diphtherieheilserums in der Weise vor, daß man die Versuchstiere mit der sicheren tödlichen Dosis einer virulenten Kultur infizierte und ihnen dann fallende Mengen Heilserum injizierte. Auf diese Weise ermittelte man die Dosis, welche genügte, um Tiere vor dem Tode zu schützen. Allein trotzdem man sich bei dieser Prüfungsmethode die größte Mühe gab, alle Störungen, die durch ungleiches Tiermaterial oder die Kulturvirulenz bedingt waren, auszuschalten, gelang es nicht, zu einer genügend sicher arbeitenden Prüfungsmethode zu kommen. Dies war auch noch nicht möglich, als man die Methode, den „Heilwert“ des Serums zu bestimmen, verließ und den „Immunisierungswert“ gegen die nachfolgende Infektion prüfte. Man kam erst zu besseren Resultaten, als v. Behring (21, 127) an die Stelle der Infektion die Intoxikation setzte, ein Verfahren, das Ehrlich bereits bei seinen Untersuchungen über die Ricinimmunität angewandt hatte.

Einen weiteren wesentlichen Fortschritt in der Prüfungstechnik des Diphtherieserums bedeutete die von Ehrlich, Kossel und Wassermann (41) ausgearbeitete Giftserummischungsmethode. Der Vorzug dieser Methode, bei welcher mit der 10fach tödlichen Dosis gearbeitet wurde, gegenüber den früheren bestand darin, daß Gift und Serum gemischt injiziert wurden, wodurch eine stets gleichmäßige Einwirkung beider Körper aufeinander innerhalb des Tierkörpers erreicht wurde. Man verfuhr dabei, um den Wert eines Serums festzustellen, in der Weise, daß fallende Dosen des zu prüfenden Serums im Reagenzglas mit dem Testgift gemischt wurden und, nachdem die Flüssigkeit auf 4 ccm aufgefüllt war, Meerschweinchen von 250 g sukutan injiziert wurden. Wenn nun z. B. die Testgiftdosis durch $^1/_{10}$ ccm Serum neutralisiert wurde, so enthielt das Serum in 1 ccm genau 1 I.E. Die Neutralisation wurde als genügend angesehen, wenn das Giftserumgemisch nur eine unbedeutende Reaktion hervorrief, die bis zum 4. Tage rückgängig geworden war (L_0 = Wert).

Aber auch diese verbesserte Methode erwies sich als nicht genügend, denn es zeigte sich, daß Sera, die mit verschiedenen Giften in den verschiedenen Instituten geprüft waren, ganz ungleiche Werte hatten, wie dies die bereits oben erwähnten Vorkommnisse in England und Dänemark bewiesen. Es ergab sich hieraus einerseits die Berechtigung der Klagen von seiten der Aerzte über Mißerfolge, als auch andererseits die

Forderung, im Interesse der Serumtherapie eine Wertbemessungsmethode zu finden, welche derartige Möglichkeiten ausschloß. Dies gelang nun EHRLICH auf Grund zahlreicher Untersuchungen, deren Ergebnisse er in seinen Abhandlungen „Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums“ (12) und „Ueber die Konstitution des Diphtheriegiftes“ (25) zuzammengefaßt hat. Ehrlich hat sich dadurch das große Verdienst erworben, die Wertbemessung des Diphtherieheilserums auf eine sichere Grundlage gestellt und das Vertrauen der Aerzte dem zum Teil arg in Mißkredit geratenen Serum wieder gewonnen zu haben.

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 schon erwähnte 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 Toxon, eine Anzahl sekundärer Gifte 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, so war es erklärlich, das man einerseits bei der Wertbemessung mit einem und demselben Gifte zu verschiedenen Zeiten als auch andererseits mit verschiedenen Giften zu der gleichen Zeit ungleiche Resultate erhalten mußte.

Eine weitere Verbesserung der neuen EHRLICHschen Prüfungsmethode bestand darin, daß EHRLICH statt der bis dahin üblichen L_0-Dosis die L†-Dosis als Prüfungsdosisis einführte. Während nämlich das Urteil, ob noch eine geringgradige Reaktion am 4. Tage vorhanden ist oder nicht, bei der ersteren Methode[1]) häufig schwierig ist und infolgedessen Meinungsverschiedenheiten entstehen konnten, wurde durch die Einführung der L†-Dosis als Prüfungsdosis an Stelle des unsicheren, mehr dem subjektiven Ermessen überlassenen Befunde ein objektiver Befund gesetzt. Der Tod bezw. 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 I.E. ermittelte. Durch diese Verbesserungen wurde es erreicht, daß die neue Prüfungsmethode mit einer

1) Die Möglichkeiten zu Differenzen liegt zum Teil darin, daß die lokale Reaktion verschieden ist, je nachdem man rein subkutan oder submuskulär injiziert. In letzterem Falle ist die Reaktion deutlich geringer.

Fehlerquelle von höchstens 2 Proz. arbeitete. Diese fast absolute Genauigkeit wurde am schlagendsten bewiesen durch Wertbemessungen, welche gleichzeitig an den verschiedensten Orten (London, Kopenhagen, Steglitz u. s. w.) vorgenommen wurden, und 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. So wird denn zur Zeit die „EHRLICHsche Immunitätseinheit“ auch im Auslande von einer großen Reihe staatlicher Institute und wissenschaftlicher Laboratorien, die regelmäßig alle zwei Monate frisch eingestelltes Standardserum vom Frankfurter Institut beziehen, bei der Wertbemessung der Diphtheriesera verwandt, und zwar insgesamt von etwa 40 Anstalten, die sich auf folgende Länder verteilen: Dänemark, England, Niederlande, Norwegen, Rußland, Oesterreich-Ungarn, Schweiz, Italien, Spanien, Portugal, Rumänien, Bulgarien, Nordamerika, Kuba, Indien und China. Wie wenig, besonders früher, die ausländischen Sera den angegebenen Werten entsprachen, möge folgende Tabelle (No. 5) zeigen, in welcher der „angegebene“ und „tat-

Tabelle Nr. 5.

Lfd. No.	Bezeichnung des Serums	Ausgegeben am?	Angegebener Wert		Im Frankfurter Institut gefundener Wert	
			? I.E. in ? ccm	? I.E. pro 1 ccm Serum	Datum der Prüfung	? I.E. 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	ung. 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

Lfd. No.	Bezeichnung des Serums	Ausgegeben am?	Angegebener Wert		Im Frankfurter Institut gefundener Wert	
			? I.E. in ? ccm	? I.E. pro 1 ccm Serum	Datum der Prüfung	? I.E. in 1 ccm Serum
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
17	Ö. 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	?	1000 / 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. 7. 04	1500 / 3,0	500	24. X. 04	> 10 < 20
35	Am. St. Ser.	14. XII. 05.	—	11,5	3. II. 06	11,5

sächliche“ Wert von 35 im hiesigen Institut untersuchten ausländischen Seris gegenübergestellt ist. In dieser Tabelle, die die besagte Tatsache klar demonstriert, sei nur auf die Nummern 2 und 34 hingewiesen, um zu zeigen, daß mehrfach selbst völlig und fast wertlose Präparate im Auslande in den Handel gebracht wurden.

Während heutzutage also in den auswärtigen Seruminstituten meist die Ehrlichsche Prüfungsmethode zur Anwendung gelangt, geschieht dies in Frankreich nicht, vielmehr erfolgt hier die Wertbemessung nach einem von dem Ehrlichschen nicht unerheblich abweichenden Verfahren.

Bei der Methode (22), wie sie im Institut Pasteur bei der Bewertung des Diphtherieserums angewandt wird, verfährt man in der Weise, daß

man das Serum 1) auf seine Schutzkraft (pouvoir préventif) und 2) auf seine Heilkraft (pouvoir curatif) prüft. 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 Dosis, 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 und ein Serum würde z. B. 1000fach sein, wenn 0,05 ccm ein Meerschweinchen von 500 g unter diesen Bedingungen zu retten vermögen.

Madsen (34) hat sich der Aufgabe unterzogen und vergleichende Prüfungen mit der Ehrlichschen und der französischen Methode angestellt. Dabei stellt sich einmal heraus, daß bei der französischen Methode selbst Unterschiede im Werte von 1 : 100 000 und 1 : 200 000 mit Sicherheit oft nicht festzustellen waren (vergl. Tab. 6). Weiterhin zeigte sich aber noch, daß das Resultat bei dieser Methode erst nach einer Woche ersichtlich ist, und daß zur Anstellung derselben stets eine Anzahl Tiere gehören, ganz abgesehen davon, daß — wenn man, wie dies gestattet ist, bei der Bestimmung der Werte mit lebenden Kulturen arbeitet — gleichmäßig verlaufende Versuchsreihen nie sicher zu erzielen sind.

Tabelle No. 6.

Serum	Verhältnis zum Gewicht des Tieres	Ausfall der Probe	Infiltration
No. 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	† $3^1/_2$ „ „ „ „	—
No. 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 „ „ „ „	—
No. 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 „ „ „ „	—
No. 4	1 : 100 000	das Meerschweinchen † $2^1/_2$ Tage nach der Einspritzung	—
	1 : 100 000	lebt	kleine Infiltration
	1 : 200 000	† $2^1/_2$ Tage nach der Einspritzung	—
	1 : 200 000	lebt	kleine Infiltration

Diese Untersuchungen Madsens beweisen also die Ueberlegenheit der Ehrlichschen Methode in Bezug auf Einfachheit, Schnelligkeit und Ge-

nauigkeit ebenso sicher, wie die oben (S. 25) genannten Experimente von Marx die Unrichtigkeit der Rouxschen Anschauung klarstellen, daß nämlich der präventive und kurative Effekt der Diphtherieheilsera besonders bestimmt werden müsse [vergl. Wernicke (123)].

Amtliche Prüfungsvorschrift.

Die von Ehrlich ausgearbeitete und vom Ministerium genehmigte Prüfungsvorschrift für die Wertbemessung des Diphtherieserums lautet folgendermaßen:

„1) Als Maßstab für die Serumbestimmung dient ein unter Ausschluß von Sauerstoff und Wasser konserviertes Serumpulver von genau bekanntem Wert. Dasselbe befindet sich in genau abgemessenen Quantitäten in besonders gearbeiteten Vakuumröhrchen. Die zur Zeit im Institut vorhandenen Apparate sind mit je 2 g eines Trockenantitoxins von 1700facher Stärke gefüllt. (NB. Unsere jetzigen Apparate enthalten 2,5 g eines Trockenantitoxins von 2544facher Stärke!)

2) Die Auflösung des Serums hat, um eine möglichst genaue Haltbarkeit zu gewährleisten, in einem aus gleichen Teilen 10-proz. Kochsalzlösung und Glycerin bestehenden Gemenge zu erfolgen. (NB. Wir benutzen jetzt eine Mischung von $^2/_3$ Glycerin + $^1/_3$ 0,85-proz. Kochsalzlösung.) Es ist zunächst alle 3 Monate (jetzt alle 2) ein Röhrchen zu öffnen und eine neue Lösung herzustellen. Von dem zur Zeit im Institut aufbewahrten Trockenserum wird der Inhalt eines Röhrchens in 200 ccm (jetzt in 636 ccm) des oben angegebenen Gemisches gelöst und so eine Testserumlösung von 17facher (jetzt 10facher) Stärke hergestellt.

3) Die jetzige Testgiftdosis wird mit Hilfe einer I.E. ermittelt, wie eine solche z. B. in 1 ccm der 17fachen (bezw. 10fachen) Verdünnung des in No. 2 erwähnten 17fachen (bezw. 10fachen) Testserums enthalten ist. Es wird diese Serummenge mit steigenden Mengen Gift versetzt und durch eine möglichst genaue Versuchsreihe der Grenzwert ermittelt, bei dem gerade ein den Tod des Versuchstieres in den ersten 4 Tagen herbeiführender Giftüberschuß manifest wird. Das so ermittelte Giftquantum stellt die jetzige Prüfungsdosis dar. Mit der gleichen Serumdosis erfolgt zur genauen Charakterisierung des Giftes die Bestimmung eines zweiten Grenzwertes, welcher die Giftdosis zu ermitteln hat, welche bei der Mischung mit der obigen Serummenge gerade neutralisiert wird.

4) Die Bestimmung des Wertes eines Diphtherieserums erfolgt mittels der nach No. 3 festgestellten Testgiftdosis in folgender Weise: Die betreffende Testgiftdosis, z. B. 0,355 eines jetzigen (d. h. damaligen) im Institut geprüften Giftes wird mit 4 ccm einer dem angegebenen Prüfungswert entsprechenden Serummenge gemischt.

Da die Testgiftdosis auf 1 ccm des einfachen, oder 4 ccm eines $^1/_4$fachen Normalserums eingestellt wird, wird bei einem Serum von

xfacher Stärke die Serumverdünnung $^1/_4$ X sein müssen, also bei der Prüfung eines 100fachen Serums $^1/_{400}$ betragen.

5) Die erhaltene Mischung wird einem Meerschweinchen von 250 bis 280 g rein subkutan injiziert. Sterben bei der von den beiden Mitgliedern des Instituts ausgeführten Prüfung die Versuchstiere innerhalb der ersten 4 Tage, so besitzt das Serum nicht die angegebene Stärke. Sterben die Tiere innerhalb des 5. und 6. Tages, so steht das Serum knapp an der Grenze des Zulässigen und ist, um die voraussichtliche baldige Einziehung zu vermeiden, den Fabriken eine 5—10 Proz betragende Aufbesserung zu empfehlen. Indurationen, die bei den Versuchstieren auftreten, sollen dagegen keinen Grund zur Beanstandung geben.

Von den gestorbenen Tieren ist eine Sektion vorzunehmen und insbesondere auf Komplikationen mit vorher bestehenden Krankheiten (Tuberkulose, Pseudotuberkulose, Pneumonie) zu achten, welche eine Ueberempfindlichkeit des Versuchstieres bedingen können.

6) Als Testgift können sowohl flüssige wie feste Gifte verwandt werden, falls bei ihnen die in No. 3 definierten Grenzwerte scharf zu ermitteln sind (und die Differenz der beiden Grenzwerte 15 einfache Todesdosen nicht überschreitet)[1]. Kommen flüssige, durch Toluol konservierte Gifte zur Verwendung, so soll dies nur geschehen, wenn 1. durch längere Voruntersuchungen die Haltbarkeit der Prüfungskonstanten erwiesen ist, 2. wenn die Prüfungsdosis 1 ccm nicht überschreitet. Die Untersuchungen über die Qualität der Testgifte sind weiter fortzusetzen.

7) Die Testgifte sind, wenn flüssig, allmonatlich durch Kulturverfahren auf Sterilität zu prüfen.

8) Das Testgift ist alle 6 Wochen mittels der Testserumdosis neu zu bestimmen, indem jedesmal die Prüfungsdosis und der Glattwert neu ermittelt wird. Sollte bei der Nachprüfung sich eine irgendwie erGift hebliche Abweichung von der Prüfungsdosis herausstellen, so ist das als in Zersetzung befindlich anzusehen und durch ein neues zu ersetzen.

9) Die Fabrikationsstätten sind darauf aufmerksam zu machen, daß das Testgift in kleineren Quantitäten sich leicht zersetzt, und daß insbesondere schon eine kurze Belichtung eine erhebliche Abschwächung hervorrufen kann. Es ist daher den Fabriken anzuraten, etwa alle 3 Wochen das Gift von neuem vom Institut zu beziehen."

Aus diesen Bestimmungen ergeben sich für die Prüfung der Diphtheriesera als zunächstliegende Aufgaben: die Herstellung des Standardserums und die Einstellung des Testgiftes.

a) Standardserum.

Der offiziellen Vorschrift entsprechend, die im Laufe der Zeit einige nebensächliche Aenderungen erfahren hat (wie aus dem in Klammern

1) Nachträglich fallen gelassen.

beigefügten Text ersichtlich ist), wird alle 2 Monate ein Standardröhrchen geöffnet und dessen Inhalt in so viel Glycerinkochsalzlösung gelöst, daß die resultierende Lösung in 1 ccm genau 10 I.E. enthält. Bei dem gegenwärtigen Standardtrockenserum muß der Inhalt des Röhrchens (2,5 g 2544faches Serum = 6360 I.E.) daher genau in soviel Flüssigkeit gelöst werden, daß eine Serumlösung von 636 ccm resultiert. Bei der Lösung des Serums sind gewisse Vorsichtsmaßregeln zu beobachten, und man verfährt daher am besten in folgender Weise: Zunächst mißt man sich 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 Menge physiologischer Kochsalzlösung nachspült. Die weitere Mischung mit dem Glycerin erfolgt in diesem „geeichten" Mischkolben (s. nebenstehende Figur). In dieses Gefäß wird, um möglichst die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, mittelst eines langen, tief in das Gefäß reichenden Trichters unter langsamem Emporziehen des letzteren so viel Glycerin und Kochsalzlösung im Verhältnis 2 : 1 zugetan, bis die Flüssigkeit genau die Marke 636 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 Luftblasen die Flüssigkeit um etwa $^1/_2$ ccm. Der Inhalt des Kolbens wird daher (am nächsten Tage) mit Kochsalzlösung genau wieder bis zur Marke 636 gefüllt und nochmals durchgeschüttelt. Diese Lösung stellt dann die fertige (2 Monate gültige) Standardlösung dar, welche nun zunächst mit dem derzeitigen Testgift geprüft wird.

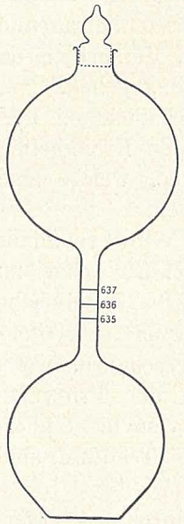


Fig. 7.

b) Das Testgift[1]).

Als Testgift benutzen wir bei der Diphtherieprüfung ausschließlich flüssige, mit Toluol konservierte Gifte, da die Herstellung von Diphtherietrockengiften äußerst schwierig ist (12).

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, so muß man zunächst versuchen, eine etwa frisch gewonnene Kultur an reines Oberflächenwachstum zu gewöhnen,

1) Vergl. auch S. 32 ff.

indem man sie möglichst häufig überimpft und dabei stets nur an der Oberfläche gewachsene Partikelchen zur Weiterzüchtung verwendet. Als Nährboden benutzen wir schwach alkalische Bouillon ohne Kochsalzzusatz.

Da die genaue Einstellung der Gifte sehr mühsam ist und einen großen Aufwand von Zeit und Tiermaterial erfordert; so empfiehlt es sich, stets große Mengen Gift zu bereiten. Aus diesem Grunde werden in der Regel von uns 20 Kolben (à 500 g Bouillon) geimpft, zumal da man auch damit rechnen muß, daß ein Teil der Kolben sich später wegen ungenügender Giftbildung als unbrauchbar erweist. Die Kolben 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-Literkolben, wobei man nach Möglichkeit das Mitfließen der Bakterien selbst zu vermeiden sucht. Nachdem jeder Kolben mit einer $1^1/_2$—2 cm dicken Toluolschicht überschüttet ist, werden die Kolben einige (2—3) Tage hindurch mehrmals täglich kräftig geschüttelt und bleiben dann 2 Tage stehen. Diese Zeit genügt, um alles Tuluol 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 gefundenen Kolben wird dann zusammen in ein größeres Gefäß gegossen und wie der mit einer hohen Schicht Toluol überschüttet. In diesem Gefäß, das im Eisschrank gegen Licht geschützt (Papierumhüllung) aufzubewahren ist, verbleibt das Gift, bis es eingestellt wird, stehen, nachdem das „Gesamtgift" vorher nocheinmal durchschüttelt, sowie auf Sterilität und seine ungefähren Giftwerte geprüft ist. Zu letzteren Versuchen entnimmt man zweckmäßig mit langer Pipette ein bestimmtes (größeres) Quantum, um nicht fortwährend das Hauptgefäß öffnen zu müssen. Es empfiehlt sich, eine Dichtung der Korken der Gefäße, in denen das Gift aufbewahrt wird, mit Paraffin vorzunehmen.

Ehe ein Gift nun endgültig als Testgift eingestellt wird, lassen wir es ungefähr ein Jahr lagern. Nach dieser Zeit ist die Umlagerung der Toxine u. s. w. 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†) stets auch die L_0- und die absolut tödliche Dosis der Gifte ermittelt. Die folgenden Tabellen zeigen die Resultate der einzelnen Versuche, welche bei der Einstellung unseres jetzigen Prüfungsgiftes angestellt wurden. Die absolut tödliche Dosis betrug Ende 1904 0,004, Ende 1905 0,005 ccm.

Die L_0-Dosis ist = 0,18 ccm und
die L†-Dosis = 0,27 ccm (Prüfungsdosis).

Das Gift ist bereits über $^3/_4$ Jahr im Gebrauch, ohne daß sich der Wert bisher geändert hat (vergl. Tabelle 4).

Ausführung einer Diphtherieserumprüfung.

Mit dem „Prüfungsgift" als Maßstab wird an der Hand der offiziellen Vorschrift die Wertbemessung eines z. B. als 400-fach zur Prüfung eingesandten Serums in folgender Weise vorgenommen:

Tabelle No. 8. Einstellung des Giftes „April“ (1904).
1) Absolut tödliche Dosis.

Dosis	Datum des Versuches						
	18. X. 04	25. X. 04	31. X. 04	5. XI. 04	23. I. 05	13. X. 05	17. XI. 05
0,001	davon	—	—	—	—	—	—
0,0015	—	—	—	—	—	—	—
0,002	davon	davon	—	—	—	—	—
0,0025	—	davon	davon	davon	davon	—	—
0,003	davon	davon	† 4	davon	davon	davon	—
0,0035	—	davon	† 4	† 3½	† 6	davon	davon
0,004	† 4	† 3	† 4	† 3½	† 4½	davon	davon
0,0045	—	† 3	davon	† 3	† 2	davon	davon
0,005	† 3	† 2	† 2	† 2	† 2	† 4½	† 4
0,0055	—	—	—	—	—	† 3	† 2
0,006	—	—	—	—	—	† 2	† 3

Absolut tödliche Dosis wird ermittelt, indem von dem Gifte eine Verdünnung z. B. von 1:1000 bezw. 1:500 hergestellt wird und von dieser Verdünnung fallende Dosen Meerschweinchen subkutan injiziert werden. Die Ermittellung dieser Dosis kann bei den individuellen Verschiedenheiten der Tiere häufig schwierig sein.

Tabelle No. 8.
2) L_0-Dosis.

Dosis	Datum des Versuches	
	9. X. 1904	3. XII. 1905
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	l. Ödem	zu stark
0,21	Ödem	Ödem

Die L_0-Dosis wird in der Weise ermittelt, daß zu 1 I.E. fallende Dosen Gift hinzugefügt und den Tieren subkutan injiziert wurden. Das Tier mit der L_0- Dosis muß natürlich am 4. Tage „glatt“ sein. Um die hierfür richtige Reaktion zu treffen, töten wir alle Tiere am 2. Tage. Es läßt sich dann mit Sicherheit diejenige Reaktion feststellen, welche erfahrungsgemäß gerade für L_0 hinreicht (vergl. S. 40).

Tabelle No. 9.
3) L†-Dosis.

Dosis des Giftes in ccm	Datum des Versuches										
	14. X. 1904	18. X. 1904	24. X. 1904	3. XI. 1904	23. I. 1905	25. II. 1905	18. III. 1905	15. IV. 1905	11. VIII. 1905 [1])	10. X. 1905	9. XII. 1905
0,25	lebt [2])	lebt	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,26	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt
0,265	—	† 3½	lebt	lebt	† 4	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt
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	† 2
0,29	† 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,3	† 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Die L†-Dosis wird in der Weise ermittelt, daß zu 1 I.E. fallende Dosen Gift hinzugefügt und die Gemische Meerschweinchen subkutan injiziert werden. Die L†-Dosis muß soviel Giftwirkung entfalten, daß die Tiere am 4. Tage akut unter typischem Befunde eingehen (lokales hämorrhagisches Oedem, Schwellung der regionären Drüsen, seröse Ergüsse, speziell in die Pleura, das Perikard und das Peritoneum, hochgerötete Nebennieren).

1) Von hier „Prüfungsgift“ mit der Prüfungsdosis = 0,27.
2) Lebt = lebt am 4. Tage.

(Schema).

Begleitschein No. .....
Kontroll-No. ..... Pferd ..... Datum der Blutentziehung: .....
Serummenge: .....
Angegebener Wert: ..... I.E.

Aussehen der Flüssigkeit: .....

Datum	Wertbestimmung und Prüfung auf ..... I.E.	
	Meerschweinchen Äußerliches Kennzeichen: Menge des eingespritzten Serums und Testgiftes: Verdünnung: Verhalten des Tieres:	Gewicht

Unschädlichkeitsprüfung:
a) an Maus
Zeichnung:
Injizierte Menge:
Verhalten:
b) an Meerschweinchen
Zeichnung:
Injizierte Menge:
Verhalten:
c) kulturell:
1 Aerob
2 Bouillon
1 Anaerob
d) Eiweißgehalt:
Bemerkungen: .....

Zunächst erfolgt die Eintragung der zu prüfenden Serumnummer in das Protokollbuch. Aus dem obenstehenden Schema sind die Punkte ersichtlich, auf deren Protokollierung zu achten ist.

Nachdem inzwischen für die Prüfung 2 Meerschweinchen (davon eines im Gewichte von 250 g) und die nötigen Nährböden (1 Traubenzuckeragar, 2 Bouillon, 1 Agarröhrchen zum Plattengießen) zum Gebrauch fertig bereitgestellt sind, erfolgt nach vorsichtigem Oeffnen eines Probefläschchens die Vornahme der Prüfung des Serums auf Sterilität durch Einsaat von 5 Tropfen Serum in jeden der 4 genannten Nährböden. Sodann wird mit phys. Kochsalzlösung eine Verdünnung des Serums von 1 : 1600 [1]) hergestellt [1 : 1600 = (1 + 39) (1 + 39)] und in einem Fläschchen die L†-Dosis mit 4 ccm der Verdünnung 1:1600 vermischt (Präzisionspipetten). Diese Mischung wird einem Meerschweinchen von 250 g Gewicht streng subkutan in der Mitte des Bauches injiziert. Zu dieser Injektion bedient man sich am zweckmäßigsten einer Kochschen Spritze mit abgestumpfter Kanüle [2]). Die Spitze der Kanüle wird in die linke Achselfalte eingestochen und vorsichtig rein subkutan bis zur Mitte des Bauches geführt, an welcher Stelle die Injektion erfolgt [3]). Sodann erhält ein zweites Meerschweinchen 10 ccm und eine Maus (von

1) Die Verdünnung 1 : 1600 statt 1 : 400 (4 ccm 1 : 1600 = 1 ccm 1 : 400) wird gewählt, um die kleinen Fehler, die durch das Umfüllen der Flüssigkeit entstehen, auf das minimalste zu reduzieren.
2) Es ist selbstverständlich, daß zu allen Prüfungsarbeiten nur sterile Apparate und Verdünnungsflüssigkeiten benutzt werden dürfen.
3) Vorsichtig injizieren, damit nicht Luft mit eindringt.

15 g Gewicht) 0,5 ccm Serum subkutan injiziert. Kurze Zeit nach der Seruminjektion tritt bei der Maus ein mehr oder weniger starkes Zittern infolge des Phenolgehaltes des Serums auf. Stirbt die Maus, so enthält das Serum mehr als 0,5 Proz. Phenol. Ueber das Verhalten der Meerschweinchen und der Maus wird genau Buch geführt. Das Prüfungstier darf lokale Erscheinungen darbieten, aber der Giftwirkung nicht erliegen, wenigstens nicht innerhalb der ersten 4 Tage; stirbt es am 5. oder 6. Tage, so steht das Serum an der Grenze des Zulässigen (s. S. 45), stirbt es früher, so wird das Serum beanstandet. Das zweite Meerschweinchen muß die Injektion der 10 ccm gut vertragen und munter bleiben. Alle eingehenden Tiere werden natürlich seziert.

Genügt das Serum allen Anforderungen, so wird es nach Abschluß der Beobachtungszeit der Tiere und Kulturen (nach 6 Tagen) zugelassen. Zu diesem Zwecke wird das dem Begleitschein beifolgende „Prüfungsergebnis" von beiden Beamten ausgefüllt und an die Fabrik zurückgesandt (welche nunmehr das Serum im Beisein des Kontrollbeamten abfüllen läßt).

Nachprüfung.

Zweimal, und zwar 6 Monate und 2 Jahre nach der ersten Prüfung, wird jede zugelassene Serumnummer bestimmungsgemäß einer Nachprüfung im Institut auf ihren Wertgehalt unterzogen. Alle Sera, die bei dieser Nachprüfung eine Abschwächung von mehr als 10 Proz. zeigen, werden als „abgeschwächt" dem Ministerium gemeldet und ihre Einziehung beantragt. Ueber 2 Jahre hinaus finden Nachprüfungen nicht mehr statt, einmal, weil diesbezügliche Versuche ergeben haben (36), daß nach dieser Zeit bei den Seris, welche sich bis dahin gehalten hatten, eine wesentliche und schnelle Abschwächung nicht mehr beobachtet wurde, und zweitens, weil in der Praxis über 2 Jahre alte Sera nur in den allerseltensten Fälle angewandt werden[1]).

Außer dieser Nachprüfung auf Abschwächung findet noch eine solche auf Keimfreiheit statt, da sich gezeigt hat, daß wahrscheinlich bei der Umfüllung der zugelassenen Serumproben in den Fabriken oder durch nicht sterile Korken manchmal Keime in die Serumfläschchen gelangen. Mit der Nachprüfung auf Sterilität der zur Anwendung kommenden Sera ist eine Reihe von Krankenhäusern beauftragt. Es sind dies: die Kinderklinik der Charité zu Berlin, das Kaiser und Kaiserin Friedrich-Krankenhaus in Berlin, das Allgemeine Krankenhaus St. Georg in Hamburg und das Städtische Krankenhaus in Frankfurt a. M. Findet ein Kranken-

1) Daß auch tropische Einflüsse im allgemeinen den Wirkungswert der Diphtheriesera nicht herabsetzen, haben uns Versuche gezeigt, welche wir bei Seris anstellen konnten, die längere Zeit in den Tropen (Transport nach China) an Bord von Schiffen und an Land aufbewahrt waren.

haus ein verunreinigtes Serumfläschchen, so hat es dem Institut die Kontrollnummer des betreffenden Serums zu berichten. Das Institut stellt nun seinerseits gleichfalls Sterilitätsprüfungen an und beantragt bei erwiesener nachträglicher bakterieller Verunreinigung die sofortige Einziehung dieser Serumnummer. Im allgemeinen kommt eine solche nachträgliche Verunreinigung von Heilseris nur äußerst selten vor.

2. Die Prüfung des Tetanusantitoxins.

Die Prüfung dieses Serums im Institut für experimentelle Therapie erfolgt einmal in der schon oben beschriebenen Weise auf seine Unschädlichkeit hin und zweitens auf seinen Wertgehalt.

Die amtliche Wertbestimmungsmethode schließt sich im großen und ganzen eng an die v. Behringsche (4, 26, 42) Methode an.

v. Behring (42) verfuhr bei der Wertbemessung in folgender Weise: Er stellte sich von dem zu prüfenden Serum Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung her, z. B. 1 ccm Serum + 99 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Von dieser Verdünnung brachte er 1 ccm in ein Erlenmeyersches Kölbchen, welches 38 ccm destilliertes Wasser enthielt, und fügte 1 ccm seines Prüfungsgiftes (Testgift No. 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 A.E., und starb die Maus, so bot die Schnelligkeit, mit welcher der Tod eintrat, Anhaltspunkte für die Beurteilung, ob sein Wert annähernd 80fach normal oder 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 erreicht, so ließ sich durch einfache Berechnung der Wert des Serums ermitteln. Diejenige Serumdosis, welche in 0,4 ccm Flüssigkeit mit 0,01 ccm Testgift No. 5 L_0, gab war genau gleich $^1/_{1000}$ A.E.

Von dieser Versuchsanordnung ausgehend ist die amtliche Wertbemessungsmethode ausgearbeitet. Die Schwierigkeiten, welche bei der Tetanusprüfung 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 natürlich notwendig, stets unter den völlig gleichen Be-

dingungen 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 entstand bei der Tetanusserumprüfung infolge der Labilität des Giftes. Notgedrungen mußte man früher bei der Prüfung in der Weise vorgehen (vergl. Dönitz [33]), 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 und 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 (36, 40), und es gelang nur aus diesem Dilemma herauszukommen durch Ausdehnung der Ehrlichschen Serumkonservierungsmethode auf das Testgift.

In welcher Weise unter Zuhilfenahme der Ehrlichschen Konservierungsmethode die Konservierung des Tetanusgiftes am zweckmäßigsten geschieht, sei zunächst kurz geschildert (36):

Eine Hauptbedingung für ein als Testgift zu verwendendes Tetanustoxin [1]) ist naturgemäß seine Sporenfreiheit. Es ist daher die erste Aufgabe bei der Testgiftherstellung, das Gift sporenfrei zu machen. Dies kann man durch Filtrieren erreichen. Wir wenden indessen die Filtration nicht an, sondern statt deren die schonendere Ausfällung durch Ammonsulfat. Das frisch gewonnene Gift, das noch große Massen Sporen enthält, wird nach der ersten Ausfällung sofort wieder in Kochsalzlösung gelöst und scharf durchzentrifugiert (eine Stunde mit guter Zentrifuge, die 4000 Touren in der Minute macht). Sodann wird die klare Flüssigkeit abgegossen und das Toxin von neuem durch Ammonsulfat ausgefällt, sogleich wieder gelöst und zentrifugiert. Diese Prozedur muß in der Regel drei- bis viermal wiederholt werden, dann erhält man meist nahezu sporenfreie Gifte. Das Gift wird als dann auf Tontellern im Vakuum getrocknet und eine Sterilitätsprüfung vorgenommen, um zu sehen, ob die Reinigung des Giftes von Sporen in der Tat eine genügende ist. Dieselbe kann als genügend angesehen werden, wenn das Gift nur noch vereinzelte Sporen enthält. Erweist sich das Gift aber noch in höherem Grade sporenhaltig, so muß die Ausfällung und Zentrifugierung desselben so lange wiederholt werden, bis die äußerste Reinheit des Präparates erreicht ist. (Vorsicht beim Hantieren mit dem sporenhaltigen Gift.)

1) Zur Giftbereitung impft man große Kolben Zuckerbouillon mit reichlichem Tetanuskulturmaterial (Bacillen oder Sporen) und hält die nach Wasserstoffdurchleitung luftfrei gemachten Kolben bei 8 Tage 37° C. Ergibt dann die Prüfung der Bouillon eine Reinkultur, so wird das Gift einer orientierenden Giftigkeitsprüfnng unterzogen und event. in der oben geschilderten Weise gleich weiter behandelt. 1 l Kulturflüssigkeit ergibt ungefähr 5—6 g Trockengift (51).

Ist diese schließlich erreicht, so wird das ausgefällte Gift im Exsikkator getrocknet. Das nunmehr sporenfreie getrocknete Gift wird im Verhältnis von 1:2 in Wasser gelöst und dann mit Präzisionspipetten in absolut 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 oben für das Standardserum beschrieben wurde. Die Menge des einzufüllenden Giftes richtet sich dabei nach den ermittelten Giftwerten des Toxins und zwar muß der Inhalt der Röhrchen 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 25 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 Glycerinlösung in seinem Wertgehalte nicht absolut konstant blieb und die weitere Erwägung, daß es wenig rationell sei, 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. Unsere jetzt im Gebrauch befindlichen Standardserumröhrchen sind mit soviel Serum (0,006 g eines 43,33fachen Serums = 0,26 I.E.) gefüllt, daß der Inhalt, in 26 ccm Wasser gelöst, genau in 1 ccm $^1/_{100}$ A.E. enthält. (Im Gegensatz zur Diphtherieserumprüfung bedienen wir uns also bei der Tetanusprüfung keiner flüssigen Testpräparate, sondern halten das für jede Prüfung nötige Testgift und Standardserum evakuiert vorrätig.) Die so konservierten Gifte und Sera sind nach unsern bisherigen Erfahrungen von einer in praktischer Beziehung unbegrenzten Haltbarkeit. Wie Versuche im hiesigen Institut gezeigt haben, erwiesen sich sogar derartig konservierte Tetanusgifte völlig unverändert, wenn sie einen Monat bei 37° C belassen waren.

Ausführung der Prüfung.

Auf Grund der bestehenden Vorschriften wird die offizielle Prüfung des Tetanusantitoxins in folgender Weise ausgeführt:

Nachdem je ein Gift- und Serumröhrchen vorsichtig durch Abfeilen geöffnet ist, wird mit einer graduierten Pipette eine bestimmte Menge (z. B. 5 ccm) Wasser in jedes Röhrchen gefüllt und die Röhrchen dann mit abgebrannten Korken sicher verschlossen. Wenn sich dann das Gift und das Serum nach mehrmaligem Schütteln vollkommen gelöst haben, wird der Inhalt der Röhrchen mit dem Rest der zur Verfügung stehenden Flüssigkeitsmengen [1]) sorgfältig nachgespült; nunmehr wird das zu prüfende Serum [2]) dem von der Fabrik angegebenen Titre entsprechend so verdünnt, daß in 1 ccm der Verdünnung genau $^1/_{100}$ A.E. enthalten sein müßte. Nachdem dies geschehen ist, erfolgt die Ansetzung der Giftserumgemische in vitro. Hierzu sind zwei Reihen (zu 8 Fläschchen) erforderlich. In die Fläschchen der ersten Reihe kommt je 1 ccm Standardserumlösung, in die zweite Reihe je 1 ccm der von dem zu prüfenden Serum hergestellten Lösung. Zu jeder Reihe gibt man fallende Dosen Gift, und zwar bei unserem Testgift Dosen von 0,8—1,5 ccm. Diese Dosen sind so gewählt, daß voraussichtlich alle Werte von L_0 bis L† getroffen sind. Dann werden die Gemische mit Wasser auf 4,0 ccm aufgefüllt [3]). Die gut verkorkten Fläschchen bleiben nunmehr $^1/_2$ Stunde bei Zimmertemperatur, geschützt gegen das Tageslicht durch Deckung mit Blechhülsen, stehen. Nach dieser Zeit erfolgt die Impfung der Tiere, und zwar benutzen wir ausschließlich weiße Mäuse. Entsprechend den angesetzten Gemischen werden zwei Reihen zu 8 Mäusen [4]) infiziert, und zwar erhält jede Maus 0,4 ccm eines der angesetzten Gemische subkutan unter die Haut des rechten Hinterfußes, also $^1/_{1000}$ A.E. + fallende Dosen Gift. Da die Giftdosen wie gesagt so gewählt sind, daß bei der Standardreihe alle Werte von L_0 bis L† vorhanden sind, so können wir bei regelrechtem Verlauf der Versuchsreihen alle Phasen, Intaktbleiben, Krankheit und akuter Tod (wenigstens in der Standardreihe) verfolgen.

Hat das zu prüfende Serum den angegebenen Titre, so müssen natürlich die Versuchsresultate in beiden Tierreihen genau zusammenfallen. Ist es dagegen schwächer, so tritt eine entsprechende Verschiebung der Resultate ein, aus der man leicht ersehen kann, um wieviel das betreffende Serum hinter dem angegebenen Titre zurückbleibt.

Die folgende Tabelle zeigt einen in dieser Weise ausgeführten Prüfungsversuch:

---

1) 20 bezw. 21 ccm, siehe oben S. 53.

2) Nach voraufgegangener Sterilitätsprüfung.

3) Aus praktischen Gründen füllt man in die Fläschchen zunächst das Wasser, und zwar Dosen von 2,2—1,5 ccm. Dann beschickt man die Fläschchen mit je 1 ccm der Standardserumlösung bezw. der Lösung des zu prüfenden Serums und füllt nun erst die Giftdosen zu.

4) Die Mäuse müssen natürlich alle das gleiche Gewicht haben.

Datum: 1. II. 05.

Tetanus-Antitoxin: Fabrik X No. y.

Eingesandt am: 31. I. 05. Eingetroffen am: 1. II. 05.

Pferd Nr. 4 u. 6.

Geblutet am 22. u. 24. IX. 04.
Menge des eingesandten Serums: 5 Liter.
Phenolgehalt: 0,5 Proz.
Angegebener Titre: 6fach.

Prüfung auf Sterilität: steril.
„ „ Phenolgehalt: Maus zittert gering.
Wertbestimmung auf: 6 A.E.

I. Standardserum: Verdünnung 0,006 : 26,0 ccm.
II. Serum: X Nr. 11. Verdünnung 1 : 600 (= 1 + 19, davon 1 + 29).
III. Normalgiftlösung:

Zu 1 ccm Serumverdünnung werden zugesetzt:

Gift	aufgefüllt	mit	Wasser	zu 4	ccm.
0,8	„	„	2,2	„ 4	„
0,9	„	„	2,1	„ 4	„
1,0	„	„	2,0	„ 4	„
1,1	„	„	1,9	„ 4	„
1,2	„	„	1,8	„ 4	„
1,3	„	„	1,7	„ 4	„
1,4	„	„	1,6	„ 4	„
1,5	„	„	1,5	„ 4	„

Die Giftserumgemische bleiben $^1/_2$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen.
Injektionsmenge: 0,4 cm.
Versuchstiere: Weiße Mäuse (15 g).

Standard-Serum.			Serum No. y.		
1.	**0,8**	Kopf gelb	9.	**0,8**	Kopf rot
	2. II. 05	0		2. II. 05	0
	3. „ „	0		3. „ „	0
	4. „ „	0		4. „ „	0
	5. „ „	0		5. „ „	0
	6. „ „	0		6. „ „	0
	7. „ „	0		7. „ „	0
2.	**0,9**	Nacken gelb	10.	**0,9**	Nacken rot
	2. II. 05	0		2. II. 05	0
	3. „ „	0		3. „ „	0
	4. „ „	0?		4. „ „	0?
	5. „ „	?		5. „ „	?
	6. „ „	?		6. „ „	?
	7. „ „	?		7. „ „	?
3.	**1,0**	Rücken gelb	11.	**1,0**	Rücken rot
	2. II. 05	?		2. II. 05	?
	3. „ „	Spürchen		3. „ „	Spürchen
	4. „ „	„		4. „ „	„
	5. „ „	Spur		5. „ „	Spur
	6. „ „	„		6. „ „	„
	7. „ „	leicht krumm		7. „ „	leicht krumm
4.	**1,1**	Steiß gelb	12.	**1,1**	Steiß rot
	2. II. 05	Spürchen		2. II. 05	Spürchen
	3. „ „	Spur		3. „ „	Spur
	4. „ „	leicht krumm		4. „ „	leicht krumm
	5. „ „	„ „		5. „ „	„ „
	6. „ „	„ „		6. „ „	„ „
	7. „ „	ziemlich deutlich krumm		7. „ „	ziemlich deutlich krumm

Standard-Serum.			Serum No. y.		
5.	1,2	rechter Vorderfuß gelb	13.	1,2	rechter Vorderfuß rot
	2. II. 05	Spur		2. II. 05	Spur
	3. „ „	leicht krumm		3. „ „	leicht krumm
	4. „ „	ziemlich deutlich krumm		4. „ „	ziemlich deutlich krumm
	5. „ „	deutlich krumm		5. „ „	deutlich krumm
	6. „ „	ziemlich stark krumm		6. „ „	ziemlich stark krumm
	7. „ „	stark krumm		7. „ „	stark krumm
9.	1,3	linker Vorderfuß gelb	14.	1,3	linker Vorderfuß rot
	2. II. 05	leicht krumm		2. II. 05	leicht krumm
	3. „ „	ziemlich deutlich krumm		3. „ „	ziemlich deutlich krumm
	4. „ „	deutlich krumm		4. „ „	deutlich krumm
	5. „ „	ziemlich stark krumm		5. „ „	ziemlich stark krumm
	6. „ „	stark krumm		6. „ „	stark krumm
	7. „ „	schwerer Tetanus		7. „ „	schwerer Tetanus
7.	1,4	rechter Hinterfuß gelb	15.	1,4	rechter Hinterfuß rot
	2. II. 05	deutlich krumm		2. II. 05	deutlich krumm
	3. „ „	ziemlich stark krumm		3. „ „	ziemlich stark krumm
	4. „ „	tetanisch		4. „ „	tetanisch
	5. „ „	† 4		5. „ „	† 4
8.	1,5	linker Hinterfuß gelb	16.	1,5	linker Hinterfuß rot
	2. II. 05	ziemlich stark krumm		2. II. 05	ziemlich stark krumm
	3. „ „	allg. Tetanus		3. „ „	allg. Tetanus
	4. „ „	† 3		4. „ „	† 3

Der im vorliegenden Falle absolut gleichmäßige Verlauf beider Versuchsreihen zeigt, daß das geprüfte Antitoxin in der Tat genau 6fach war.

Wie wir aber aus dem Gesagten ersehen können, ist die Wertbemessung des Tetanusantitoxins viel komplizierter als die des Diphtherieheilserums (101). Aus diesem Grunde wird auch eine absolut genaue Werteinstellung von seiten der Fabrik bei Einsendung der Präparate nicht verlangt. Zwar müssen auch hier die Sera mit einer bestimmten Titreangabe zur Prüfung eingesandt werden, wenn sich aber dieselben bei der Prüfung als nicht vollwertig erweisen, so werden sie doch nicht direkt zurückgewiesen, wie bei der Diphtherieserumprüfung, sondern das Institut stellt in diesem Falle die Sera genauer ein und läßt sie zu dem gefundenen Titre zu, vorausgesetzt, daß sie den Mindestgehalt von 5 bezw. 50 A.E. in 1 ccm flüssigem bezw. in 1 g Trockenserum haben und den sonstigen Anforderungen der Prüfungsvorschrift genügen.

b) Die Wertbemessung der antibakteriellen Sera.

Um die bakterizide Kraft eines Serums zu messen, sind verschiedene, mehr oder weniger sicher arbeitende Methoden versucht und angewandt worden. Bei fast allen hat man als Indikator der spezifischen Serumwirkung die Bakterienvernichtung, und zwar in erster Linie die Bakteriolyse, sei es in vivo oder in vitro, benutzt. Unter den verschiedenen, auf der Bakteriolyse beruhenden Methoden nimmt der „Pfeiffersche Versuch“ die erste Stelle ein als ein Verfahren, das, wie R. Pfeiffer (46—47) und seine Schüler zeigen konnten, bei gewissen Seris, z. B.

dem Choleraserum, eine genau quantitative Wertbemessung gestattet. Spritzt man nämlich einem Meerschweinchen lebende Choleravibrionen zusammen mit fallenden Dosen Choleraimmunserum intraperitoneal ein, so läßt sich mit Sicherheit diejenige Serummenge ermitteln, welche gerade noch ausreicht, um das Tier gegen eine bestimmte Prüfungsdosis, z. B. gegen die 10fache tödliche Dosis virulenter Kultur zu schützen, welche Dosis R. Pfeiffer als 1 I.E. bezeichnete [vergl. auch Friedberger (48)].

Eine Erklärung der beim Pfeifferschen Versuch in der Peritonealhöhle sich abspielenden bakteriolytischen Vorgänge verdanken wir neben R. Pfeiffer in erster Linie Metschnikoff (49) und Bordet (50), welche erkannten, daß es sich hierbei um die kombinierte Wirkung zweier Substanzen handelt, von denen die eine, wie Bordet nachwies, sehr labil ist und auch im normalen Serum vorkommt (Ehrlichs Komplement), während die andere ziemlich stabil ist und als Produkt der spezifischen Immunisierung aufzufassen ist (Ehrlichs Ambozeptor).

Ein tieferes Eindringen in die Kenntnis der Bakteriolyse wurde allerdings erst durch die Hämolysinforschung ermöglicht, da man hier in die Lage versetzt wurde, im Reagenzglas mit Ausschaltung des Tierkörpers genaue quantitative Versuche vornehmen zu können und den Mechanismus der Lysine ohne Schwierigkeit zu verfolgen (129). Nach den grundlegenden Untersuchungen Ehrlichs und Morgenroths (15) verläuft der Vorgang der Hämolyse in der Weise, daß der Ambozeptor von den Blutkörperchen spezifisch gebunden wird und daß er sie durch weitere Bindung des Komplements für die Wirkung desselben zugängig macht. Weitere Untersuchungen ergaben dann zwischen den Hämolysinen und den Bakteriolysinen in Bezug auf den Wirkungsmechanismus eine weitgehende Uebereinstimmung. Speziell Ehrlich und seine Mitarbeiter M. Neisser, Morgenroth, Sachs, Kyes u. a. (15) konnten nachweisen, daß hier und dort streng spezifische und chemische Beziehungen zwischen Ambozeptor und Zelle einerseits, sowie zwischen Ambozeptor und Komplement andererseits bestehen, welche quantitativen Gesetzen folgen. Dementsprechend hatten ja auch schon R. Pfeiffer und seine Schüler den Nachweis führen können, daß man mittels des Pfeifferschen Versuchs bei Innehaltung bestimmter Kautelen den spezifischen Wirkungswert (i. e. den Ambozeptorgehalt) eines Choleraimmunserums genau quantitativ bemessen kann.

Indessen ergab die weitere Erfahrung bald, daß der Pfeiffersche Versuch nur bei einigen Seris zur Wertbestimmung brauchbar war, bei vielen anderen dagegen nicht, weil hier das Pfeiffersche Phänomen ausblieb. Man versuchte daher, statt der Bakteriolyse im Tierkörper, die Bakteriolyse in vitro als Wertbemessungsmethode zu benutzen. Unter den verschiedenen Methoden (128), welche auf der Bakterienvernichtung in vitro beruhen, erwies sich hierfür als besonders geeignet das sogenannte „Plattenverfahren“. Eine große Reihe von Forschern hat sich bemüht, mit Hilfe dieser Methoden den quantitativen Nachweis bakteriolytischer Stoffe in den bakteriziden Seris zu erbringen, allein die Resultate, die sie erzielten, waren äußerst ungleichmäßig und die empfohlenen Verfahren meist viel zu kompliziert. Erst M. Neisser und Wechs-

BERG haben durch Einführung brauchbarer Versuchsanordnungen die „Plattenmethode“ zu einer praktisch anwendbaren Wertbemessungsmethode vervollkommnet.

Der Gang der Prüfung bei dieser Methode, deren genaue Technik M. NEISSER in EHRLICHS gesammelten Arbeiten zur Immunitätsforschung (15) angegeben hat und die später von verschiedenen Seiten zum Nachweis bakterizider Antikörper sowohl in normalen als auch in Immun- bezw. Rekonvaleszentenseris mit Erfolg angewendet wurde, ist nach M. NEISSER und WECHSBERG (70) der,

„daß z. B. je $^1/_{5000}$ ccm einer eintägigen Bouillonkultur des betreffenden Bakteriums in eine Reihe steriler Röhrchen gegeben wurde. Dazu kamen wechselnde Mengen des bei 56° inaktivierten Immunserums und gleiche Mengen des komplettierenden aktiven Serums oder in anderen Reihen gleiche Mengen Immunserum und wechselnde Mengen des komplettierenden Serums. Die Abmessungen waren derart, daß überall gleiche Mengen Flüssigkeit (gewöhnlich 2,5 ccm) vorhanden waren. Die Verdünnungen und Auffüllungen geschahen mit 0,85-proz. NaCl-Lösung. Außerdem wurden jedem Röhrchen 3 Tropfen Bouillon zugefügt, nachdem wir uns überzeugt hatten, daß dadurch ein ungestörtes Wachstum in den Kontrollproben gewährleistet war. Umfangreiche Kontrollen waren allerdings jedesmal nötig, schon um die benutzten Sera auf Sterilität zu prüfen. Die Proben wurden während 3 Stunden bei 37° gehalten und dann zu Agarplatten verarbeitet, indem mit gleichmäßigen Pipetten je 5 Tropfen zur Aussaat verwendet wurden. Die Beurteilung der Platten geschah stets vergleichs- und schätzungsweise, etwa nach folgendem Schema: 0, vereinzelt, Hunderte, Tausende, unendlich.“

Wenn nun diese Methode in der Prüfungstechnik von uns nicht angewandt wird, so beruht das einmal darauf, daß bei derselben häufig andere Werte gefunden wurden als im Tierversuch [wie dies auch jüngst die Arbeiten KOLLES und seiner Mitarbeiter (112) bestätigt haben], und daß zweitens auch diese Methode nur bei ganz bestimmten Seris anwendbar war und unter anderen gerade bei den Seris versagte, die für die amtliche Serumprüfung in Betracht kamen.

Von den anderweitigen Methoden die zur Wertbemessung der spezifischen Wirksamkeit der antibakteriellen Sera in neuerer Zeit vorgeschlagen und versucht sind, seien in kurzem hier noch ein von BORDET und GENGOU (141) bereits 1901 angegebenes Verfahren und eine zuerst von WRIGHT (54, 133) angewandte Methode erwähnt. Das erstere beruht darauf, daß die mit Ambozeptor beladenen Bakterien im stande sind, Komplemente in vitro an sich zu reißen, so daß nach Zusatz eines hämolytischen Systems die ganz oder teilweise ausbleibende Hämolyse einen Rückschluß auf den Gehalt des Serums an Ambozeptoren gestattet. Mit Hilfe dieses Verfahrens gelang es GENGOU (53), auch Ambozeptoren für die gelösten Eiweißstoffe nachzuweisen, und durch die Untersuchungen von MORESCHI (55), NEISSER und SACHS (56, 57) und GAY (58, 120) hat es heute eine große Bedeutung erlangt, besonders nachdem M. NEISSER und SACHS auf Grund dieses Verfahrens zu einer neuen Methode der Eiweißdifferenzierung gelangt sind und dieselbe in der forensischen Praxis als Blutunterscheidungsmethode eingeführt haben; als Methode zum quantitativen Nachweis antibakterieller Ambozeptoren ist dieses Verfahren dann von WASSERMANN und BRUCK (59), sowie KOLLE und WASSERMANN (60) beim Meningokokkenserum angewandt worden.

Die genaue Methodik, wie sie KOLLE und WASSERMANN beim Meningokokkenserum anwandten, besteht darin, daß man Flüssigkeiten, welche Bakterienleibessubstanzen gelöst enthalten, mit dem Immunserum, welches Antikörper für die betreffende Bakterienart enthält, mischt. Alsdann verankert sich der spezifische Immunkörper (Ambozeptor) an die in der Flüssigkeit gelösten Leibessubstanzen der Bakterien. Fügt man nun zu dem Gemisch etwas normales komplementhaltiges Serum hinzu, so reißt die Verbindung Ambozeptor + Bakteriensubstanz Komplement an sich. Setzt man dann nachträglich ein hämolytisches System zu dem beschriebenen Gemische hinzu, so tritt keine vollständige oder doch nur eine teilweise Hämolyse ein. Aus dieser mehr oder weniger starken Hemmung der Hämolyse „läßt sich ein Rückschluß auf den Grad des Verbrauches an Komplement und, da dieser proportional ist dem vorhandenen Immunkörper, auf den Gehalt des Immunserum, z. B. des Meningokokkenserums an Ambozeptoren machen.“ KOLLE und WASSERMANN wählten dabei die Versuchsanordnung so, daß sie zu gleich bleibenden Mengen (0,1 ccm) des durch einstündige Erwärmung auf 60° C inaktivierten Immunserums abgestufte Mengen eines bestimmten, mit Karbol versetzten Bakterienextraktes hinzufügten und alsdann als Komplement 0,1 ccm normales Meerschweinchenserum hinzugaben. Die Mischung blieb für 1 Stunde bei 37°. Dann wurde das hämolytische System zugesetzt. Die Befunde werden nach 2-stündigem Verweilen bei 37° C + 24-stündigem Stehenlassen im Eisschrank notiert. Die Versuche verliefen vollkommen quantitativ. — Allein selbst KOLLE und WASSERMANN äußern sich zu dieser Methode, daß sie dieselbe noch nicht als endgültig abgeschlossen betrachten können.

Nicht unwichtig für die Beurteilung des Wertes dieser BORDET-GENGOUschen Methode scheint mir aber der von NIDRIGAILOFF (61) erhobene Befund, daß sich die einzelnen gegen die gleichen Infektionserreger hergestellten Immunsera insofern verschieden verhalten können, als man bei dem einen zwar im stande ist, mittelst dieses Verfahrens das Vorhandensein spezifischer Ambozeptoren nachzuweisen, während dieser Nachweis bei einem zweiten Serum nicht gelingt. So verliefen z. B. Versuche mit einem von NIDRIGAILOFF untersuchten Pariser Rotlaufserum und dem ARONSONschen Streptokokkenserum negativ, während andererseits die gleichen Versuche mit einem Charkower Rotlaufserum und einem Pariser Streptokokkenserum positiv ausfielen. Auch M. NEISSER (15) hatte schon früher gefunden, daß diese Methode in einigen Fällen nicht zum Ziele führte.

Die zweite Methode, die zuerst von WRIGHT (54, 133) praktisch angewandt wurde, beruht auf der Erscheinung, daß bestimmte Sera die Fähigkeit erlangen, Bakterien, welche mit denselben vorbehandelt wurden, in der Weise zu stimulieren (METSCHNIKOFF), daß sie in vitro im Gegen-

satze zu unbehandelten Bakterien von den Leukocyten schneller und besser aufgenommen werden. Diese spezielle Eigenschaft bestimmter Sera nannte WRIGHT „opsonisch". Nachdem schon früher DENYS und LECLEFF (62) bei ihren Studien über die Immunität gegen Streptokokken das gleiche Phänomen (auch in vitro) beobachtet hatten [von BORDET (63) wurden die Resultate in vitro zunächst damals nicht bestätigt] hat in neuerer Zeit speziell NEUFELD (64, 103, 125) sich unabhängig von WRIGHT mit dem Studium der Wirkungsweise dieser „Bakteriotropine„ eingehender beschäftigt. Eine praktische Verwendung hat aber auch diese Methode bisher nicht gefunden, da einmal diese Substanzen nach den bisherigen Untersuchungen nur bei ganz bestimmten Seris in größerer Konzentration vorzukommen scheinen und andererseits selbst bei diesen, z. B. bei den Antistreptokokkenseris, soweit sie bisher staatlich geprüft werden, der Tierversuch dieser Methode an Einfachheit und Sicherheit weit überlegen ist. KOLLE und WASSERMANN (65), welche auch diese Methode zur Wertbemessung ihres Meningokokkenserums zu verwenden suchten, äußern sich auf Grund der Versuche ihres Mitarbeiters LÖHLEIN dahin, daß „diese von WRIGHT Opsonine, von NEUFELD Bakteriotropine genannten Substanzen für eine exakte Wertbemessung des Meningokokkenserums kaum zu benutzen sind". „Denn da die Leukocyten verschiedener Tierarten selbst in gewaschenem Zustande, noch stärker aber unter Zusatz von normalem Serum einen großen Teil der Meningokokken in sich aufnehmen, so ist eine exakte, zahlenmäßige Beurteilung, in welch quantitativ höherem Maße ein Immunserum diese Vorgänge steigert, äußerst schwierig und in erheblichem Maße subjektiv. Wir lassen dabei die Frage, in welchen Beziehungen die die Phagocytierbarkeit der Kokken bewirkenden Substanzen des normalen (Opsonine WRIGHTS) und des spezifischen Serums (bakteriotrope Substanzen NEUFELDS) zueinander stehen, offen. Abgesehen von diesen Schwierigkeiten, kommen indessen hierbei auch noch sehr große individuelle Schwankungen in Betracht."

Diese letztgenannten Methoden, welche alle auf den Tierversuch verzichten, müssen nun abgesehen von den praktischen Scwierigkeiten auch theoretisch zu schweren Bedenken bezüglich ihrer Brauchbarkeit als Wertbemessungsmethoden Anlaß geben insofern, als wir bei ihnen die Wirksamkeit nur ganz bestimmter, im Reagenzglas in Aktion tretender Körper messen können, während wir auf die Berücksichtigung einer Reihe von Körpern verzichten müssen, welche zweifelsohne bei der Schutzwirkung der Sera in vivo eine große Rolle spielen. Wie wir wissen, enthält ja jedes mit Bakterien hergestellte Immunserum außer den rein bakteriziden Antikörpern sicher noch eine große Reihe anderer spezifischer Produkte der Immunisierung, so z. B. Antitoxine, Präzipitine, Agglutinine. Wenn nun auch die Rolle der Agglutinine und Präzipitine bei der Schutzwirkung in vivo keine sehr große sein dürfte, so

ist die Wirkung der Antitoxine z. B. doch nicht zu unterschätzen. Speziell beim Dysenterieserum haben TODD, ROSENTHAL und GABRITSCHEWSKY (cit. nach 140) und in neuerer Zeit KRAUS[1]), sowie VAILLARD und DOPTER (140) nachgewiesen, daß dessen Wirksamkeit sicher gleichzeitig auf seiner antitoxischen Eigenschaft beruht. Ein solches zugleich antitoxisches Serum bewirkt vielleicht hauptsächlich indirekt die Abtötung der Bakterien, indem es sie der Schutzwaffe beraubt, welche sie gegen die Körperkräfte zu entfalten vermögen.

Weiterhin ist in Betracht zu ziehen, ob nicht auch noch andere Stoff z. B. Antiagressine (122) oder Anti-Endotoxine bei gewissen Seris eine Rolle spielen. Bezüglich der letzteren haben MACFADYEN (66, 73) und BESREDKA (67, 74) gerade in neuerer Zeit den Nachweis erbracht, daß bei geeigneter Immunisierung, z. B. mit den Typhusbacillen, ein Anti-Endotoxin erzeugt werden kann, und es scheint nach den üblichen Immunisierungsmethoden nicht ausgeschlossen, daß alle antibakteriellen Sera eine gewisse Quote Anti-Endotoxin enthalten.

Aus allen diesen Gründen sehen wir uns gezwungen, ausschließlich im Tierversuch eine Entscheidung über die antiinfektiöse Wirksamkeit eines Serums zu versuchen, da allein hier alle Faktoren, welche die Bakterien bekämpfen und vernichten, in Aktion treten und gleichzeitig zur Wirkung gelangen, während bei der Bakteriolyse in vitro eine bestimmte, vielleicht gerade wichtige Quote ungemessen bleiben kann.

Dadurch, daß wir aber auf den Tierversuch angewiesen sind, entstehen nunmehr eine Reihe prüfungstechnischer Schwierigkeiten, auf welche hier näher eingegangen werden muß.

Zunächst ist für die große Mehrzahl der antibakteriellen Sera wohl daran festzuhalten, daß ihre Wirkungsweise nach dem Ambozeptortypus EHRLICHS stattfindet. Dadurch ist aber zugleich die Prüfung der Wirksamkeit dieser Sera in schwerer Weise gegenüber den antitoxischen Seris kompliziert, denn während wir bei den Antitoxinen die Beziehungen allein zwischen Toxin und Antitoxin zu berücksichtigen hatten, haben wir hier von vornherein mit der vom Ambozeptor zum Bakterium und mit der vom Ambozeptor zum Komplement zu rechnen.

Vorausgesetzt nun, daß die bei der antibakteriellen Wirkung der Sera in Aktion tretenden Antikörper in der Tat Ambozeptoren (bezw. Polyzeptoren) sind, so ergeben sich theoretisch hieraus für die Prüfungstechnik bestimmte Komplikationen, die zunächst durch den Bau (oder die Avidität) der Ambozeptoren bedingt sein können. Wir müssen auf die hierdurch für die Prüfungstechnik entstehenden Schwierigkeiten speziell bei der Prüfung der Schweineseuchensera zurückkommen und soll daher an dieser Stelle auf dieselben nicht näher eingegangen werden. Dagegen möchte ich hier kurz auf diejenigen Komplikationen hin-

1) Vortrag auf d. fr. Mikrobiolog. Verein. in Berlin 1906.

weisen, welche bei der Bindung zwischen Ambozeptor und Komplement von seiten des Komplements entstehen können.

Bekanntlich hatten Ehrlich und Morgenroth (l. c.) bei ihren Hämolysinstudien nachgewiesen, daß durchaus nicht jedes Komplement geeignet ist, jeden Ambozeptor zu komplettieren, und daß die Wahrscheinlichkeit hierfür um so größer ist, je näher das zu schützende Individuum dem Individuum steht, von dem das Immunserum gewonnen wurde, daß bei einer fernstehenden Species aber eine oft nur ganz unvollständige Komplettierung einzutreten pflegt. Dies ist ja leicht erklärlich, da der Ambozeptor nach seiner Entstehung in einem bestimmten Tierkörper spezifisch für das betreffende Bakterium und das bestimmte Komplement sein muß. Gerade bei den Untersuchungen mit bakteriolytischen Seris fand man hierfür einige markante Beispiele.

So fand Wechsberg (68), daß der durch Immunisierung von Tauben mit Vibrio Metschnikoff gewonnene Ambozeptor mit Taubenserum komplettiert wird, dagegen nicht der durch Immunisierung von Kaninchen erhaltene. Ein ähnliches Beispiel konnten Kolle und Verfasser (69) bei ihren Studien über die Wirkung des Pestserums konstatieren. Ein bei Ratten und Mäusen hochwirksames, vom Pferde gewonnenes Pestserum, versagte vollständig am Meerschweinchen, während bei diesen Tieren ein vom Meerschweinchen gewonnenes Immunserum, das bei Ratten und Mäusen absolut keine nennenswerten schützenden Eigenschaften zu entfalten vermochte, deutlich wirksam war.

Ohne auf die zahlreichen übrigen Schwierigkeiten, welche infolge der komplizierten Beziehung zwischen Ambozeptor und Komplement entstehen können, näher einzugehen, sei hier nur noch auf die eventuelle Bedeutung der von M. Neisser und Wechsberg (70) zunächst in vitro nachgewiesenen Komplementablenkung für die Prüfungstechnik hingewiesen. Es sprechen viele Beobachtungen in der Tat durchaus dafür, daß auch in vivo durch einen bedeutenden Ueberschuß von Ambozeptor die bakterizide Kraft eines Serums nicht nur stark geschwächt, sondern unter Umständen sogar aufgehoben werden kann (118 u. a. 113, 114, 115).

Aus dem bisher Gesagten ergibt sich also, daß wir zwar bestimmte Mengen Ambozeptor einem Tiere zuführen können, daß wir indes infolge des komplizierten Baues von Ambozeptor und Komplement, sowie der komplizierten Wirkungsweise beider Komponenten nie voraussagen können, inwieweit die zugeführten Ambozeptoren in der Tat durch die im Einzelfalle disponiblen Komplemente komplettiert werden, wodurch natürlich ein quantitatives Messen in hohem Grade erschwert werden muß. In gewissen Fällen kann man nun aber die komplettierenden Leistungen des Organismus durch bestimmte Eingriffe (zeitlich getrennte Seruminjektion und Infektion, intraperitoneale Injektion der Bakterien) wesentlich verbessern, wie dies die Untersuchungen von Marx (71) beim Rotlaufserum gezeigt haben, auf die ich später noch zurückkommen werde.

Für die Prüfungstechnik ergibt sich hieraus zunächst die Aufgabe, geeignetes Tiermaterial zu finden, welches das in der Regel von Pferden gewonnene Serum, das in der Praxis bei irgend einer anderen Tierart verwandt werden soll, genügend gleichmäßig komplettiert, wie dies z. B. die Maus beim Rotlaufserum tut. Dieses Serum wird bekanntlich von Pferden gewonnen, an der Maus geprüft und beim Schwein angewandt.

Daß die hier auftretenden Schwierigkeiten häufig recht große sein können, haben uns speziell die schon erwähnten Versuche (l. c.) gezeigt, welche mit dem Sobernheimschen Milzbrandserum angestellt wurden. Es ist bisher (auch bei neueren Versuchen im Institut und in der Merkschen Filiale in Halle a. S.) nicht gelungen, eine Tierart zu ermitteln (außer Schafen), welche dieses Serum genügend gleichmäßig komplettiert. Andererseits erwiesen sich aber die Schafe selbst als wenig geeignete Tiere zu Prüfungsversuchen, einmal wegen der Unmöglichkeit, an ihnen in einem gewöhnlichen Laboratorium zu experimentieren, und zweitens, weil sie sich der Infektion mit Milzbrandbacillen gegenüber in hohem Grade verschieden empfänglich erwiesen.

Wir kommen damit zu einer ähnlichen Bedingung, wie sie bei der Wertbemessung eines antitoxischen Serums erfüllt sein mußte, nämlich dem Besitz einer Tierspecies, welche für die bei den Prüfungsversuchen anzuwendenden Bakterien von genügend gleichmäßiger „Empfänglichkeit“ bezw. „Resistenz“ ist. Hier besitzen wir nun allerdings in der Maus ein Tier, welches für diese Zwecke sehr geeignet ist und daher in der Serumprüfung ausgedehnte Verwendung findet. Allerdings gibt es auch eine Reihe überhaupt nicht oder doch nur in mäßigem Grade tierpathogener Bakterien, die nur für den Menschen pathogen sind und gegen die man Immunsera herstellt. In diesen Fällen ist aus den oben näher ausgeführten Gründen eine Wertbemessung bisher noch nicht möglich gewesen.

Wassermann und Kolle (l. c.) haben in dem schon zitierten speziellen Falle bei der Wertbemessung des Meningokokkenserums, wo es sich um solche gering tierpathogenen Bakterien handelte, versucht, einen sicher tödlichen Infektionsmodus für Meerschweinchen (Mäuse lassen sich in diesem Falle nach ihren Angabe nicht verwenden) dadurch zu erreichen, daß sie die natürlichen Widerstandskräfte des Körpers künstlich herabzusetzen versuchten. Nachdem schon Bettencourt (97) diesen Zweck durch Einverleibung von Antikomplementserum vergeblich zu erreichen getrachtet hatte, gingen Kolle und Wassermann dazu über, mit Hilfe der künstlichen Aggressine Wassermanns (96) eine für normale Meerschweinchen unschädliche Dosis Meningokokken tödlich zu gestalten, in der Absicht, zu untersuchen, ob das Immunserum alsdann die mit künstlichem Aggressin und Kultur injizierten Tiere von dem Tode bewahren könnte. Allein die Versuche ergaben, daß die Ergebnisse der Prüfungsreihen nie so unzweideutig waren, daß man darauf eine exakte Wertbemessung gründen konnte, wenngleich sich mit Sicherheit die Anwesenheit von Schutzstoffen in den Immunseris nachweisen ließ.

Vorausgesetzt nun, daß es sich um die Prüfung eines mit tierpathogenen Bakterien hergestellten Serums handelt, tritt häufig noch

eine weitere Reihe von Schwierigkeiten auf, welche die Wertbemessung derartiger Sera stark komplizieren. Dieselben können zunächst durch die Virulenzschwankungen der Kulturen bedingt sein[1]).

Selbst wenn man durch häufiges Ueberimpfen und regelmäßige Tierpassagen für eine gute Virulenz der Kulturen Sorge trägt, ist es oft nicht möglich, die erforderliche Höhe und Gleichmäßigkeit in der Virulenz der Kulturen mit Sicherheit zu erzielen. Aber schon Pfeiffer und Kolle (72, 117) haben bei der Wertbemessung des Typhusserums gezeigt, daß für die Titrierung eines Serums die Anwendung einer Kultur von genügender Virulenz von größter Bedeutung ist, und so kann es nicht angängig sein, die Beurteilung des Wirkungswertes eines bakteriziden Serums allein nach seiner Wirksamkeit gegenüber der Infektion mit einer bestimmten Dosis einer virulenten Kultur durchzuführen. Indessen gelang es Ehrlich verhältnismäßig leicht, die hieraus entstehenden Schwierigkeiten zu überwinden, und zwar durch Einführung eines Standardserums von bekanntem Titre als Maßstab für die Virulenz der Kultur. Er verfuhr dabei in der Weise, daß bei jedem Prüfungsversuch zwei Versuchsreihen angesetzt wurden, eine mit dem Standardserum und eine zweite mit dem zu prüfenden Serum. Die Standardserumreihe gab alsdann die Menge Serum an, welche gegen die angewandte Infektion schützte und die zweite Versuchsreihe ließ durch Vergleich mit der ersten mit Leichtigkeit erkennen, welche Wirksamkeit dieses Serum im Vergleich zum Standardserum gegenüber der gleichen Infektion auszuüben vermochte. Auf diese Weise war es möglich, auf eine ganz bestimmte Virulenz der Prüfungskulturen zu verzichten. Wie wichtig aber die Ausschaltung der Kultur als Träger des Wertmaßes war, haben spätere Beobachtungen nach Einführung des Standardserums gelehrt, welche man bei der Wertbemessung des Rotlaufserums im hiesigen Institut zu machen Gelegenheit hatte. Es zeigte sich nämlich, daß gegen die gleiche Infektion, welcher die Kontrollmäuse prompt in 48 Stunden erlagen, anfangs 0,01 ccm, später aber schon 0,001 ccm desselben Standardserums schützte. Es hatte also die Kultur, ohne daß eine Virulenzabnahme gegenüber den nicht mit Serum behandelten Tieren erkennbar wurde, doch schon eine wesentliche Abschwächung bezw. Resistenzverminderung dem Serum gegenüber erfahren. (Da sich bei diesen Kulturen die Virulenzabschwächung gegenüber den unbehandelten Tieren meist erst viel später

1) Auf die Möglichkeit einer (durch eine ungleichmäßige Beeinflussung der Kulturen durch das Immunserum verursachten) Störung, wie sie z. B. bei vereinzelten Typhuskulturen im Pfeifferschen Versuch beobachtet ist (109, 116), soll hier nicht näher eingegangen werden. Derartige Kulturen sind eben zu Prüfungszwecken nicht geeignet. Es sei bei dieser Gelegenheit bemerkt, daß bisher zu allen Prüfungen der „provisorisch staatlich geprüften" antibakteriellen Sera die Fabriken ihre eignen Immunisierungskulturen einsenden mußten.

bemerkbar macht, so hat man in der Prüfung mit einem Standardserum ein Mittel, Abschwächungen der Kulturen sehr frühzeitig zu erkennen!)

Den Wertgehalt der bakteriziden Sera bemessen wir nun stets durch Prüfung ihres „Schutzwertes", da bei fast allen eine eigentliche kurative Wirkung sich experimentell vielleicht noch schwerer nachweisen läßt als bei den Antitoxinen[1]). Während hier v. Behring (l. c.) und seine Schüler (104), sowie Dönitz (75, 126) 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 (76), Issaeff (77), sowie von Sobernheim und Jacobitz (78) hervor, daß die zeitliche Heilungsgrenze z. B. beim Choleraserum im Pfeifferschen Versuch eine außerordentlich beschränkte ist. Mit Immunserum allein gelang es letzteren, nur ganz kurze Zeit nach der Infektion noch Heilung zu 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 (6, 111) 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 (52, 79) beobachtet wurde und in der Weise erklärt wird, daß die bakteriziden Kräfte der Sera zwar noch im stande 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 bei allen der staatlichen Kontrolle bisher unterstellten Seris als Normalserum ein solches betrachtet worden, von dem 0,01 ccm gegen die nachfolgende (mehrfach) tödliche Dosis schützt (1 ccm dieses Serums = 1 I.E.). Im Laufe der Zeit hat sich aber der Usus 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 Seris zu Grunde 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

1) Vergl. Aronson (82).

Prüfung unterstellten antibakteriellen Seris Standardsera von bestimmtem Gehalt an Immunitätseinheiten.

1. Das Schweinerotlaufserum.

Die erste Wertbemessungsmethode für das Rotlaufserum stammt von Lorenz (80), welcher das (zu der von ihm eingeführten kombinierten Schutzimpfung benötigte) Serum auf seine Brauchbarkeit in folgender Weise prüfte: er infizierte graue Mäuse in Hauttasche mit 0,01 ccm einer Bouillonkultur und injizierte diesen Tieren 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.

Schütz und Voges (81, 131) dagegen bestimmten den Schutzwert des Rotlaufserums an Mäusen in der Weise, daß sie Serum und Kultur (0,1 ccm = ca. 110fache tödliche Dosis) gemischt gleichzeitig subkutan injizierten.

In ähnlicher Weise wurde ursprünglich auch die Prüfung im Institut für experimentelle Therapie ausgeführt. Eine immer gleichbleibende Menge Bouillonkultur wurde, gemischt mit fallenden Mengen Serum, einer Reihe von weißen Mäusen unter die Haut gespritzt. Diejenigen Mäuse, welche nach 10 Tagen noch gesund waren, wurden als maßgebend angesehen und nach der zu diesem Schutze nötig gewesenen Serummenge der Wert des Serums bezeichnet.

Trotzdem man aber besondere Mühe auf die gleichmäßige Ausführung der Versuche verwandte, gelang es doch nicht, Prüfungsreihen von der gewünschten Regelmäßigkeit zu erhalten, so daß die Wertbemessungs-Versuche häufig wiederholt werden mußten. Dieser Uebelstand gab die Veranlassung dazu, daß weitere Versuche zur Verbesserung der Methode angestellt wurden.

Bei diesen Untersuchungen, die Marx (71) im hiesigen Institut ausführte, ergab sich als Ursache der Störungen die mangelhafte und langsame Komplettierung des Rotlaufserums durch den Organismus der Mäuse. Es dauerte scheinbar mehrere Stunden, ehe das mit den Kulturen gemischt injizierte Serum aktiviert wurde, und so hatten allem Anscheine nach die Bakterien inzwischen Gelegenheit gefunden, sich im Körper des Tieres zu vermehren. Das später aktivierte Serum fand dann, den individuellen Verhältnissen entsprechend, durchaus verschiedene Mengen Kultur vor, wodurch wie anzunehmen war die störenden Unregelmäßigkeiten entstanden. 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 gab (subkutan) und dann 24 Stunden später die Impfung vornahm, und zwar intraperitoneal, damit „die Bakterien in einer Weise dem Tiere zugeführt werden, daß sie der Wirkung

des Immunkörpers sofort unterliegen und eine Wucherung ausgeschlossen wird".

Diese neue Methode ergab nun praktisch sehr gute Resultate, wie dies auch Nachprüfungen außerhalb des Instituts, z. B. von Casper (in Höchst), bestätigt haben. Auch heute prüfen wir noch nach diesem Verfahren, welches für verschiedene andere Methoden vorbildlich geworden ist, nur wählen wir als Prüfungstiere statt der grauen jetzt in der Regel weiße Mäuse. Diese bieten den Vorteil, daß man bei ihnen, wie schon Marx fand, die Infektion bereits nach einer Stunde vornehmen kann (sie aktivieren also scheinbar das Immunserum schneller als graue Mäuse) und daß sie viel leichter zu beschaffen sind als letztere.

Bei der amtlichen Rotlaufserumprüfung verfahren wir seit den Untersuchungen von Marx nunmehr in folgender Weise: Es werden zwei Prüfungsreihen angesetzt, eine mit Standardserum — das bei jeder Prüfung stets frisch gelöst wird — und eine zweite mit dem zu prüfenden Rotlaufserum —, wobei sich der Grad der Verdünnung nach den Angaben der Fabrik richtet. Das Standardserum ist in der für jede Prüfung nötigen Menge von 0,5 ccm (= 0,05 Trockenserum) in Ehrlichschen Vakuum-Trockenapparaten eingeschlossen und hat den konventionell angenommenen Wert von 100 I.E. in 1 ccm[1]). In der Regel schützen 0,015 ccm dieses Standardserums gegen die folgende Infektion mit der Prüfungsdosis (= $^1/_{100}$ ccm einer virulenten 24-stündigen Bouillonkultur). Um alle Uebergänge von L† bis L_0 in den Versuchsreihen vorzufinden, werden daher folgende Verdünnungen von Standardserum angewandt:

0,01	= 0,5	der	Verdünnung	1 : 50
0,015	= 0,3	„	„	1 : 20
0,02	= 0,4	„	„	1 : 20
0,0275	= 0,55	„	„	1 : 20
0,035	= 0,7	„	„	1 : 20.

Ist der Titre des zu prüfenden Serums ebenfalls als 100fach[2]) angegeben, so hat man dementsprechend mit den gleichen Dosen und Verdünnungen zu arbeiten.

Mit jeder Serumdosis werden zwei weiße Mäuse subkutan injiziert. Nach einer Stunde folgt zugleich mit der Infektion von zwei Kontrollen die intraperitoneale Infektion der Tiere mit $^1/_{100}$ ccm 24-stündiger Bouillonkultur.

Verlaufen die Versuchsreihen regelmäßig, so müssen die Kontrollen in 2 × 24 Stunden, spätestens 3 × 24 Stunden sterben. Außerdem müssen von den mit Standardserum behandelten Tieren diejenigen mit 0,01 ccm mit einer Verzögerung von einigen Tagen eingehen, während alle anderen Tiere davonkommen sollen, und zwar zeigen in der Regel die Tiere mit 0,015 noch schwere, die mit 0,02 noch leichte Krankheits-

1) Vergl. S. 65.
2) Bestimmungsgemäß müssen alle Rotlaufsera mindestens 100fach sein.

erscheinungen. Die eingegangenen Tiere werden seziert, um interkurrente Krankheiten als Todesursache auszuschließen.

Die Beobachtung der Versuchstiere wird 8 Tage lang fortgeführt, der Prüfungsabschluß findet demnach am 9. Tage statt. Entspricht in dem oben angegebenen Falle z. B. das 100fache Serum seinem Titre, so muß die zweite Versuchsreihe einen der ersten Reihe vollständig parallelen Versuchsverlauf zeigen. Sterben von dieser Reihe noch die Tiere mit 0,015 ccm, so ist das Serum selbstverständlich nicht vollwertig [1]).

Ueber den Verlauf der Prüfung findet eine genaue Protokollierung statt, wie aus dem folgenden Beispiel ersichtlich ist:

Datum: 29. V. 05. Rotlaufserum No. H 62. Fabrik: H.
Eingesandt am: 26. V. 05. Eingetroffen am: 29. V. 05.
Kontroll-No. 62. Pferde: 34, 36, 47.
Geblutet: 15. und 16. VII. 04, 4. IV. 05.
Menge: 25 Liter.
Angegebener Titre: 100fach.
Geprüft auf: 100fach.
Keimgehalt: steril.
Bemerkungen: Zugelassen am: 6. VI. 05.

I. Standardserum.

0,01	0,015	0,02	0,0275	0,035
0,5 $^1/_{50}$	0,3 $^1/_{20}$	0,4 $^1/_{20}$	0,55 $^1/_{20}$	0,7 $^1/_{20}$

II. Zu prüfendes Serum H 62:

0,01	0,015	0,02	0,0275	0,035
0,5 $^1/_{50}$	0,3 $^1/_{20}$	0,4 $^1/_{20}$	0,55 $^1/_{20}$	0,7 $^1/_{20}$

III. Kontrollen.

$^1/_{100}$ = 0,3 1:30 24-stündige Bouillonkultur.
Weiße Mäuse (15 g); Differenz zwischen Seruminjektion und Infektion 1 Stunde.

Standardserum

1a	0,01	1b	
30. V. 05	0	30. V. 05	krank?
31. „ „	0?	31. „ „	krank
1. VI. „	krank	1. VI. „	krank
2. „ „	krank	2. „ „	† 4
3. „ „	† 5		

2a	0,015	2b	
30. V. 05	0	30. V. 05	0
31. „ „	0	31. „ „	0
1. VI. „	krank	1. VI. „	0?
2. „ „	krank	2. „ „	krank
3. „ „	bess. sich	3. „ „	krank
4. „ „	bess. sich	4. „ „	bess. sich
5. „ „	gesund	5. „ „	0?
6. „ „	0	6. „ „	0

Serum H 62

6a	0,01	6b	
30. V. 05	0?	30. V. 05	0?
31. „ „	0?	31. „ „	0?
1. VI. „	krank	1. VI. „	krank
2. „ „	krank	2. „ „	† 4
3. „ „	krank		
4. „ „	krank		
5. „ „	krank		
6. „ „	krank		

7a	0,015	7b	
30. V. 05	0	30. V. 05	0?
31. „ „	0?	31. „ „	?
1. VI. „	krank	1. VI. „	krank
2. „ „	bess. sich	2. „ „	krank
3. „ „	0?	3. „ „	bess. sich
4. „ „	0	4. „ „	0?
5. „ „	0	5. „ „	0
6. „ „	0	6. „ „	0

1) Da es vorkommen kann, daß einmal ein Tier „ausfällt“ (z. B. infolge Verletzung bei der Kulturinjektion oder weil das Tier latent krank war), so sind für jede Dosis immer 2 Tiere vorgesehen.

Standardserum

3a	0,02	3b	
30. V. 05	0	30. V. 05	0
31. „ „	0?	31. „ „	0?
1. VI. „	krank?	1. VI. „	0?
2. „ „	0?	2. „ „	0
3. „ „	0	3. „ „	0
4. „ „	0	4. „ „	0
5. „ „	0	5. „ „	0
6. „ „	0	6. „ „	0

4a	0,0275	4b	
30. V. 05	0	30. V. 05	0
31. „ „	0	31. „ „	0
1. VI. „	0	1. VI. „	0
2. „ „	0	2. „ „	0
3. „ „	0	3. „ „	0
4. „ „	0	4. „ „	0
5. „ „	0	5. „ „	0
6. „ „	0	6. „ „	0

5a	0,035	5b	
30. V. 05	0	30. V. 05	0
31. „ „	0	31. „ „	0
1. VI. „	0	1. VI. „	0
2. „ „	0	2. „ „	0
3. „ „	0	3. „ „	0
4. „ „	0	4. „ „	0
5. „ „	0	5. „ „	0
6. „ „	0	6. „ „	0

Serum H 62

8a	0,02	8b	
30. V. 05	0	30. V. 05	0
31. „ „	0?	31. „ „	0?
1. VI. „	0?	1. VI. „	krank?
2. „ „	0	2. „ „	0?
3. „ „	0	3. „ „	0
4. „ „	0	4. „ „	0
5. „ „	0	5. „ „	0
6. „ „	0	6. „ „	0

9a	0,0275	9b	
30. V. 05	0	30. V. 05	0
31. „ „	0	31. „ „	0
1. VI. „	0	1. VI. „	0
2. „ „	0	2. „ „	0
3. „ „	0	3. „ „	0
4. „ „	0	4. „ „	0
5. „ „	0	5. „ „	0
6. „ „	0	6. „ „	0

10a	0,035	10b	
30. V. 05	0	30. V. 05	0
31. „ „	0	31. „ „	0
1. VI. „	0	1. VI. „	0
2. „ „	0	2. „ „	0
3. „ „	0	3. „ „	0
4. „ „	0	4. „ „	0
5. „ „	0	5. „ „	0
6. „ „	0	6. „ „	0

Kontrollen.

11a		11b	
30. V. 05	krank	30. V. 05	krank?
31. „ „	† 2	31. „ „	krank, fast agonal
		1. VI. „	† 2 $^1/_2$

2. Das polyvalente Schweineseuchenserum (provisorisch staatlich geprüft seit 1902).

Das polyvalente Schweineseuchenserum wird von dem Pharmazeutischen Institut L. W. Gans in Frankfurt a. M. nach den Angaben der Proff. Wassermann und Ostertag hergestellt, und zwar werden zur Immunisierung der Pferde möglichst zahlreiche Stämme des Schweineseuchebakteriums von möglichst verschiedener Provenienz gewählt. Zur Herstellung derartiger „multipartialer Sera“ wurden Wassermann und Ostertag (84) durch folgende Erwägungen veranlaßt:

W. und O. nehmen auf Grund ihrer Untersuchungen an, daß alle Schweineseuchebakterien zwar gemeinsame dominante Rezeptoren besitzen, daß aber jeder einzelne Stamm Partialrezeptoren besitzt, die bei den einzelnen Stämmen erheblich voneinander abweichen. Dementsprechend resultiert bei der Immunisierung mit nur einem Stamme ein Serum, das neben den allen Schweineseuchebakterien gemeinsamen Rezeptoren 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, haben W. und O. vorgeschlagen, nicht mit einem Stamme die Immunsera gegen Schweineseuche herzustellen, sondern bei der Herstellung derselben so vorzugehen, daß man den Tieren verschiedene Bakterienstämme der gleichen Species bei der Immunisierung injiziert und die Sera mit verschiedenen Stämmen immunisierter Tiere mischt (124). Auf diese Weise soll ein „multipartiales", gegen verschiedene Stämme wirksames (polyvalentes) Serum erzielt werden. Ueber die verschiedene Wirkungsart mono- und polyvalent gewonnener Sera äußern sich die Autoren selbst folgendermaßen:

„Vergleichen wir den verschiedenen Bau und damit die verschiedene Wirkungsweise eines mono- und eines polyvalenten Serums, so ist der Hauptunterschied zwischen beiden folgender: Das polyvalente Serum setzt sich aus einer weit größeren Anzahl verschiedener Partialteile, entsprechend den individuell schwankenden Nebenrezeptoren, zusammen, als das monovalente Serum. Wir haben schon eingangs darauf aufmerksam gemacht, daß das polyvalente Serum, wie wir es auffassen, sich grundsätzlich von jenen polyvalenten Seris nach dem Typus des Denysschen Streptokokkenserums unterscheidet. Es ist daher richtiger, daß wir solche Sera, wie sie Jensen, Tavel, Moser, Wechsberg, Lipstein, Lipschütz und Volk, Römer, wir u. a. vorschlagen, nicht mehr polyvalente Sera, sondern um das, was sie ihrem Wesen nach von diesen scharf unterscheidet, prägnanter hervortreten zu lassen, multipartiale Sera nennen. Der eine von uns[1]) hat an anderer Stelle bereits diesen Namen in Vorschlag gebracht.

Bei der genaueren Betrachtung der verschiedenen Wirkung eines monovalenten und multipartialen Serums, speziell des Schweineseuchenserums, müssen wir also vor allem berücksichtigen, daß das Immunserum, d. h. die Ambozeptoren, die beim Immunisieren eines Tieres entstehen, sich zusammensetzt aus der Summe der den einzelnen Partialrezeptoren des Bakterienleibes entsprechenden Partialambozeptoren. Bezeichnen wir den dominanten Rezeptor in einem Mikroorganismus mit D und die in einem beliebigen Stamm Schweineseuche vorhandenen Nebenrezeptoren als N_1, N_2, N_3, N_4, so wird das mit diesem Stamme gewonnene Serum sich zusammensetzen aus $AD + AN_1 + AN_2 + AN_3 + AN_4$, wobei A = Ambozeptor ist. Nehmen wir einen zweiten und dritten Stamm, die sich von dem ersteren in den Nebenrezeptoren individuell unterscheiden, also wiederum D, aber Nebenrezeptoren N_1, N_3, N_5, N_6, einen dritten D, N_3, N_5, N_6, N_7, und wir immunisieren nun ein Tier gleichzeitig mit diesen drei Stämmen, so wird dementsprechend der entstehende Ambozeptor sich zusammensetzen aus dem gemeinschaftlichen dominanten Rezeptor AD und aus der Summe der Nebenrezeptoren $+ AN_1 + AN_2 + AN_3 + AN_4 + AN_5 + AN_6 + AN_7$. Entsprechend der geringeren Anzahl von Partialambozeptoren in dem ersten, dem monovalenten Serum, wird dafür jeder Partialanteil in größerer Menge von dem Tiere produziert werden, in dem

1) Wassermann, Verhandlungen des internat. Kongr. für Hygiene zu Brüssel 1903. Festschrift zum 60. Geburtstage Robert Kochs. Jena 1904.

multipartialen Serum dagegen werden mehr Partialambozeptoren, dafür aber jeder einzelne in geringerer Höhe vorhanden sein. Es wird also bei der Immunisierung mit nur einem Stamme ein Serum entstehen, das bezüglich seiner wenigen Partialambozeptoren sehr hoch ist, das aber in Bezug auf die Zahl der verschiedenen Partialambozeptoren sehr wenig breit ist. Umgekehrt werden wir bei der Immunisierung mit mehreren Stämmen ein Serum erhalten, das jeden einzelnen Partialambozeptor weniger konzentriert, dafür aber weit mehr differente Partialambozeptoren enthält. — Wenn wir uns dies körperlich vorzustellen versuchen und als Vergleichsobjekt dafür etwa ein altrömisches Fascesbündel nehmen, das einen Stab darstellt, der sich aus der Summe einzelner Stäbe zusammensetzt, so repräsentiert das monovalente Serum einen hohen Stab, der sich aus wenigen einzelnen Stäben komponiert, das multipartiale umgekehrt einen kürzeren, aber bedeutend dickeren, da er weit mehr einzelne Stäbe enthält. Damit stimmt die Wirkung eines monovalenten und multipartialen Serums, die wir beim experimentellen Vergleich der beiden nachweisen können, überein, wie die nachfolgenden Arbeiten zeigen.

Ein monovalentes Serum wirkt, wenn es zufälligerweise einen Stamm trifft, auf den seine Partialambozeptoren einpassen, bereits in geringeren Mengen als ein multipartielles. Dafür aber gibt es eine große Anzahl Stämme, für die es nur den dem dominanten Rezeptor entsprechenden dominanten Ambozeptor zur Verfügung hat, währenddem die individuell schwankenden Nebenrezeptoren in ihm nicht genügend vertreten sind. Einen solchen Stamm wird alsdann ein hohes monovalentes Serum nur bis zu einem gewissen Grade, aber für die Praxis ungenügend beeinflussen, wie gleichfalls die nachfolgenden Versuche zeigen. Dagegen wird das multipartiale Serum den einzelnen Stamm erst in einer etwas höheren Konzentration beeinflussen. Dafür hat es aber den Vorteil, daß, sofern es genügend multipartial ist, kaum ein Stamm vorkommen wird, bei dem es nicht infolge seines großen Gehaltes an den verschiedensten Nebenrezeptoren schützende Wirkung übt.

Da nun nach den Untersuchungen von Ehrlich und seinen Schülern auch bei den Komplementen des lebenden Organismus, die ja zur Komplettierung des Ambozeptors unerläßlich sind, sich dominante und Nebenkomplimente nachweisen lassen, so ergibt ein multipartiales Serum auch eine bessere Ausnützung der vorhandenen Komplemente".

Entsprechend dem Antrage der Fabrik erfolgt nun die Wertbemessung dieses Serums in der Weise, daß der Wirkungswert desselben gegen 8 verschiedene Stämme Schweineseuche (die bisher von dem Pharmazeutischen Institut L. W. Gans selbst geliefert wurden), im Tierversuch geprüft wird.

Ich möchte bei dieser Gelegenheit betonen, daß wir zu unterscheiden gezwungen sind zwischen „polyvalent" im allgemeinen und im rein prüfungstechnischen Sinne. Prüfungstechnisch können wir unter „polyvalenten" Seris nur solche Sera verstehen, welche im Prüfungsversuch gegen die verschiedensten Stämme zu schützen vermögen. Es ist dabei in gewissem Sinne 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 natürlich auch mit einem solchen besonders geeigneten Stamm ein „polyvalentes“ Serum erzielen, das tatsächlich gegen verschiedene Stämme im Tierversuch schützt. Jedenfalls zwingt uns die Angabe, daß ein Serum auf „Polyvalenz“ geprüft werden soll, zu einem Prüfungsverfahren, in dem tatsächlich das betreffende Serum gegen eine Reihe verschiedener Stämme im Tierversuch geprüft wird, ein Verfahren, das natürlich den Prüfungsmodus nicht unwesentlich kompliziert.

Die Anordnung des Prüfungsversuches ist kurz folgende:

Es werden zwei Parallelreihen zu je 6 weißen Mäusen angesetzt. und zwar eine mit dem konventionell als 100fach angenommenen Standardserum und eine zweite mit dem zu prüfenden Serum, das dem ersten mindestens gleichwertig sein muß. Die Dosen, welche den einzelnen Tieren injiziert werden, sind folgende:

Standard:		Zu prüfendes Serum:
Maus 1a und 1b	0,005 = 0,5 $^1/_{100}$	Maus 7a und 7b
„ 2a „ 2b	0,0075 = 0,75 $^1/_{100}$	„ 8a „ 8b
„ 3a „ 3b	0,01 = 0,5 $^1/_{50}$	„ 9a „ 9b
„ 4a „ 4b	0,015 = 0,3 $^1/_{20}$	„ 10a „ 10b
„ 5a „ 5b	0,02 = 0,4 $^1/_{20}$	„ 11a „ 11b
„ 6a „ 6b	0,03 = 0,6 $^1/_{20}$	„ 21a „ 12b

Nach 24 Stunden erhalten die Mäuse die Infektionsdosis gleichfalls subkutan. Zur Herstellung dieser Impfdosis wird von jedem der 8 Stämme (24stündige Bouillonkultur) eine Verdünnung von 1:30 mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und werden diese Verdünnungen dann gemischt. Von dieser Kulturmischung erhält jedes Tier beider Versuchsreihen zusammen mit zwei Kontrollen je 0,3 ccm (= $^1/_{100}$) subkutan injiziert.

Die Beobachtungsdauer der Tiere beträgt 10 Tage. Die Kontrollen sollen in 2—3 Tagen eingehen.

3. Das Schweineseuchenserum „Suisepsin“
(provisorisch staatlich geprüft seit 1904).

Unter der Bezeichnung „Suisepsin“ bringen die Höchster Farbwerke ein Serum zur Bekämpfung der Schweineseuche in den Handel, das im Gegensatz zu dem erstgenannten polyvalenten Serum nach Ostertag und Wassermann als ein monovalentes nach seiner Prüfungsart zu bezeichnen ist. Bei seiner Prüfung wird nämlich die Infektion nur mit einem Stamme ausgeführt. Die Anordnung des Prüfungsversuches ist im übrigen die gleiche, wie sie beim vorigen Serum beschrieben wurde. Zur Infektion wird $^1/_{100}$ ccm einer virulenten 24stündigen Bouillonkultur verwandt, eine Dosis, welche die Kontrollen in spätestens 2—3 Tagen tötet.

Beobachtungsdauer 10 Tage.

4. Geflügelcholeraserum „Galloserin“
(provisorisch staatlich geprüft seit 1904).

Zur Bekämpfung der Geflügelcholera wird von den Höchster Farbwerken ein Serum hergestellt, das unter der Bezeichnung „Galloserin“ in den Handel gebracht wird. Als Maßstab zur Wertbemessung dient ein Standardserum mit dem konventionell angenommenen Titre von 100 I.E.

Die Prüfung erfolgt auch bei diesem Serum in der Weise, daß fallende Dosen Serum weißen Mäusen subkutan injiziert werden (0,005 — 0,0075 — 0,01 — 0,015 — 0,02 — 0,03), und daß 24 Stunden später die Tiere mit $^1/_{100}$ ccm einer virulenten Hühnercholerakultur intraperitoneal infiziert werden. Diese Dosis genügt, um die Kontrollen in 24—36 Stunden zu töten.

Die Beobachtungsdauer beträgt 10 Tage.

5. Das Antidysenterieserum
(provisorisch staatlich geprüft seit 1904).

Das Antidysenterieserum wird von dem Pharmazeutischen Institut L. W. Gans nach den Angaben Shigas (92, 132) als antibakterielles Serum hergestellt. Da es zur Anwendung beim Menschen bestimmt ist, wird natürlich bei diesem Serum völlige Keimfreiheit gefordert.

Die Wertbemessung des Serums erfolgt bisher[1]) an weißen Mäusen in der Weise, daß die Tiere das Serum subkutan erhalten und 24 Stunden später mit virulenten Ruhrbacillen intraperitoneal infiziert werden. Als Standardserum dient vorläufig ein karbolisiertes Serum mit dem Titre 0,01 (0,01 schützt gegen die folgende tödliche Infektion).

Die bei dem Prüfungsversuch zur Anwendung gelangenden Serumdosen sind: 0,001 — 0,002 — 0,005 — 0,01 — 0,02 — 0,05 ccm. Die zur Prüfung zu benutzende Kultur muß so virulent sein, daß mindestens 0,2—0,3 ccm die Tiere sicher in 1—3 Tagen töten. Größere Kulturmassen kann man nicht anwenden, da ihre Injektion scheinbar stark toxisch wirkt und die Versuchsreihen stört. Dieses Versagen des Serums gegenüber hohen toxisch wirkenden Infektionsdosen dürfte auf seiner geringen Wirkung gegenüber den Endotoxinen beruhen. Inwieweit dem Gansschen Serum auch eine rein antitoxische Wirkung zukommt (vergl. auch S. 61 bezüglich antitoxischer Wirkung des Antidysenterieserums) läßt sich nach dem bisher üblichen Prüfungsmodus nicht sagen.

Die Beobachtungsdauer beträgt 6 Tage.

6. Das Antistreptokokkenserum
(provisorisch staatlich geprüft seit 1902).

Die Chemische Fabrik auf Aktien (vorm. E. Schering) in Berlin stellt unter Leitung von Aronson (82, 83) ein Antistreptokokkenserum

1) Wahrscheinlich dürfte später eine Wertbemessung der antitoxischen Wirksamkeit dieses Serums (ähnlich der Prüfung des Diphtherieserums) notwendig werden.

her, das der staatlichen Prüfung unterstellt ist. Als Maßstab bei der Wertbemessung dieses Serums dient ein Standardserum mit dem konventionell angenommenen Titre von 20 Aronsonschen I.E. (Als Normalserum bezeichnet Aronson ein Serum, von dem 0,01 ccm eine Maus gegen die 10—100fach tödliche Dosis schützt. 1 ccm dieses Serums = 1 I.E.)

Bezüglich der Wertbestimmung dieses Serums ist folgendes vorauszuschicken:

Aronson benutzt zur Herstellung seiner Antistreptokokkensera zwei verschiedene Arten von Streptokokken, einmal solche von höchster, durch Tierpassagen erzielter 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 diesem läßt sich natürlich nur die erste (im Tierversuch wirksame) Quote messen, während die zweite bisher nicht bei der Prüfung berücksichtigt werden kann und ihr gleichmäßiger Gehalt 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 4 Parallelreihen mit fallenden Dosen Serum (subkutan injiziert) angesetzt, Reihe 1 + 3 werden vorbehandelt mit dem Standardserum, Reihe 2 + 4 mit dem zu prüfenden Serum. 24 Stunden später wird in den ersten beiden Parallelreihen (1 + 2) die Infektion mit $^1/_{100\,000}$, in den beiden anderen Reihen mit $^1/_{10\,000}$ ccm intraperitonel vorgenommen, und zwar von einer Kultur, die noch in der Verdünnung 1 : 1 000 000 weiße Mäuse akut innerhalb 24—48 Stunden tötet. Die Ausführung von zwei Doppelreihen ist einmal nötig, weil sich gezeigt hat, daß die Wirkung der Streptokokkensera bei der Anwendung verschieden starker Infektionen oft eine verschiedene ist, und daher sich eine genaue Wertbemessung meist nur bei einer bestimmten Infektionsdosis ausführen läßt und andererseits, weil die Kulturen häufig starke Virulenzschwankungen aufweisen.

Wie die mehrfachen, im Institut ausgeführten Prüfungsversuche ergeben haben, läßt sich nach der von Aronson ausgearbeiteten Methode in der Tat die Wertbemessung eines Antistreptokokkenserums mit genügender Genauigkeit durchführen.

Die zur Anwendung gelangenden Serumverdünnungen ergeben sich aus dem folgenden Protokoll einer solchen Antistreptokokkenserumprüfung:

5. IX. 04 — Serum Schering 7
Kontroll-No. 7 — Pferd 1 u. 4
gebl. 21. VIII. u. 28. VIII. 04
Menge: 5 Liter

Angegebener Titre: 20fach
geprüft auf: 20fach
Keimgehalt: steril

Serie I. 1 : 100 000 — Kontrollen: K. + Stss. gelb + 1½; K. + Rü. gelb + 1					Serie II. 1 : 10 000 — Kontrollen: K. + Stss. rot + 1; K. + Rü. rot + 1½				
Serumdosis	I Standard Zeichen	I Standard Erfolg	II Schering 7 Zeichen	II Schering 7 Erfolg	Serumdosis	III Standard Zeichen	III Standard Erfolg	IV Schering 7 Zeichen	IV Schering 7 Erfolg
$^1/_{500}$	K. g.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	K. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	$^1/_{500}$	l. Vs. g.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	l. Vs. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0
$^1/_{1000}$	N. g.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	N. R.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	$^1/_{1000}$	r. S. g.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	r. S. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0
$^1/_{2000}$	R. g.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	R. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	$^1/_{2000}$	l. S. g.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	l. S. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0
$^1/_{3000}$	Stss. g.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	Sts. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	$^1/_{3000}$	b. S. g.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	b. S. r.	7. IX. 0 8. „ 0? 9. „ 0 10. „ 0
$^1/_{4000}$	r. Vs. g.	7. IX. kr. 8. „ † 2 9. „	r. Vs. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	$^1/_{4000}$	r. O. g.	7. IX. 0 8. „ † 2 9. „	r. O. r.	7. IX. 0 8. „ kr. 9. „ † 3
$^1/_{5000}$	l. Vs. g.	7. IX. 0? 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	l. Vs. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ 0 10. „ 0	$^1/_{5000}$	l. O. g.	7. IX. 0 8. „ † 2	l. O. r.	7. IX. 0 8. „ † 2
$^1/_{6000}$	r. Hfs. g.	7. IX. 0 8. „ kr. 9. „ † 3	l. Hfs. r.	7. IX. 0 8. „ 0 9. „ †3	$^1/_{6000}$	b. O. g.	7. IX. 0 8. „ † 2	b. O. r.	7. IX. 0 8. „ 0? 9. „ kr. 10. „ † 4

Die Beobachtungsdauer beträgt 4 Tage.

c) Prüfung des Tuberkulins.

Die staatliche Prüfung des Tuberkulins erfolgt nach einer von Dönitz (85) ausgearbeiteten Modifikation des Kochschen (86) 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 das Verhältnis angegeben, damit dementsprechende Verdünnungen vorgenommen werden können. Im Interesse der Herstellung möglichst gleichwertiger Tuberkuline wurde früher nur ein Mindestquantum von 100 l zur Prüfung zugelassen. Diese Serummenge ist später auf 50 l herabgesetzt, und zwar dürfen solche Fabrikationsstätten, welche nicht 50 l in einem halben Jahre absetzen, 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 1½ Jahren liegen.

Die ursprüngliche Kochsche Prüfungsmethode bestand darin, daß an tuberkulös gemachten Meerschweinchen geprüft wurde, ob mindestens 0,5 ccm des zu prüfenden Präparates im stande 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 veterinärärztliche Beobachtungen ließen es nun aber erwünscht erscheinen, feste Normen für den Wirkungswert des Tuberkulins zu erhalten und es wurde daher das Institut (1897) mit Versuchen zur Ermittelung eines festen, den Verhältnissen angepaßten Maßstabes für die Wertbestimmung des Tuberkulins beauftragt.

Umfangreiche, von Dönitz ausgeführte Versuche ergaben nun 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[1]), daß es aber möglich ist, den Wirkungswert des Tuberkulins ziemlich genau mit einer für die Praxis vollkommen ausreichenden Schärfe zu bestimmen, wenn die Kochsche Prüfungsweise in bestimmter Weise modifiziert wurde.

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 Titres 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, welche vollkommen analog denen waren, die durch die Virulenzschwankungen der Bakterien bei der Wertbemessung der bakteriziden Sera bedingt sind, ließen sich hier wie dort gleichfalls mit Leichtigkeit durch Einführung eines Standardtuberkulins von bekanntem Werte überwinden. Durch den einfachen Weg der Einführung eines Standards konnte man sich auch bei der Tuberkulinprüfung unabhängig machen von dem Grade der Tuberkulose der Tiere, indem

1) Daß die durch von Lingelsheim (87) inaugurierte Prüfung durch intracerebrale Injektion an Meerschweinchen ganz unsichere Resultate ergab, hat Neufeld (88) nachgewiesen (vergl. auch Dönitz, 136).

man nunmehr den bei der betreffenden Standardtuberkulinserie gefundenen Wert als Maßstab für die Giftigkeit des zu prüfenden Präparates benutzte.

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 wurde allein bedingt durch die individuellen Schwankungen in der Tuberkulose-Empfänglichkeit der Tiere. Er ließ sich so gut wie ganz ausschalten, als man gelernt hatte, mit ganz besonderen Vorsichtsmaßregeln speziell bei der Auswahl der Versuchstiere und bei der Infektion vorzugehen. Es erwies sich dabei als durchaus notwendig, nur solche Meerschweinchen zu den Prüfungsversuchen auszuwählen, welche durch stetige Gewichtsabnahme gezeigt hatten, daß sie über die besonders ungleichmäßigen Anfangsstadien der Krankheit hinaus waren. Die gewünschte Gleichmäßigkeit des nötigen Tiermaterials ließ sich weiter dadurch erreichen, daß man für jede Prüfung stets eine große Anzahl Tiere infizierte und sich durch fortlaufende Wägungen über das Fortschreiten der Tuberkulose bei den einzelnen Tieren orientierte.

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—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 Wertbemessungsversuch reif sind. Zu diesem Zwecke injiziert man einer Anzahl Tieren (2—4) fallende Dosen Standardtuberkulin und zwar 0,3—0,5. Diese Dosen müssen hinreichen die Tiere zu töten. Tötet selbst 0,5 die Tiere nicht, so muß man noch einige Zeit mit der Anstellung des Versuchs warten. Im anderen Falle folgt sogleich der Prüfungsversuch. Bei diesem setzt man zwei Parallelreihen zu 5—6 Tieren an. Die erste Reihe der Tiere erhält fallende Dosen Standardtuberkulin, um die minimal tödliche Dosis zu ermitteln, die zweite Reihe die entsprechenden Dosen des zu prüfenden Präparats, 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—0,015—0,2—0,3 ccm, da sich gezeigt hat, daß der Titre bei Verwendung reifer Tiere meist bei 0,1 bezw. 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. Bestehen Differenzen, so wird, falls das zu prüfende Präparat minderwertig ist, dasselbe beanstandet, im anderen Falle, falls es kräftiger wirkend ist, wird der Fabrik mitgeteilt, wie stark das Tuberkulin zu verdünnen ist, damit seine Wirkung dem des Standardtuberkulins entspricht.

Nach diesem Verfahren ist es bei Beachtung der genannten Vorsichtsmaßregeln und Vermeidung sonstiger Fehlerquellen möglich gewesen, durchaus zufriedenstellende Resultate zu erzielen, wie ich dies vor einiger Zeit in einer kurzen Mitteilung im Klinischen Jahrbuch (89) an der Hand unserer Protokolle gezeigt habe.

Bei einem gleichwertigen Präparat, wie es z. B. das am 11. April 1904 geprüfte Tuberkulin H 10 war, ergibt sich folgendes Prüfungsprotokoll:

Tuberkulin H 10.
Eingesandt am: .....
Geprüft am: 11. April 1904
Menge: 50 l.
Keimgehalt: steril.

Verdünnung	Standard		Sektionsbefund	Tier	Zu prüfendes Tuberkulin: Erfolg	Sektionsbefund
	Tier	Erfolg				
0,05	1	lebt		7	lebt	
0,075	2	„		8	„	
0,1	3	†	typisch	9	†	typisch
0,15	4	†	„	10	†	„
0,2	5	lebt	(fällt aus)	11	†	„
0,3	6	†	typisch	12	†	„

Ich habe gerade dieses Protokoll gewählt, um an der Hand desselben darauf hinzuweisen, daß man bei der Prüfung des Tuberkulins auch jetzt noch damit rechnen muß, daß 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. Zum Vergleiche zeigt das folgende Protokoll eine Tuberkulinprüfung, auf Grund deren das betreffende Präparat als minderwertig bezeichnet werden mußte:

Tuberkulin „A“
Eingesandt am: .....
Geprüft am: 30. Mai 1903
Menge: .....
Keimgehalt: .....

Verdünnung	Standard			Tuberkulin „A“		
	Tier	Erfolg		Tier	Erfolg	
0,1	1	†	typisch	8	lebt	
0,15	2	†	„	9	„	
0,2	3	†	„	10	„	
0,25	4	†	„	11	„	
0,3	5	†	„	12	„	
0,4	6	†	„	13	†	typisch
0,5	7	†	„	14	†	„

d) Die Prüfung des Taurumans.

Die Höchster Farbwerke bringen seit kurzem einen von ihnen nach den Vorschriften von R. Koch und Schütz (90) hergestellten Impfstoff zur Verhütung der Tuberkulose der Rinder in den Handel, der auf ihren Antrag der staatlichen Kontrolle unterstellt ist.

Dieser Impfstoff, der unter der Bezeichnung „Tauruman“ direkt an die Tierärzte abgegeben wird, besteht aus einer Emulsion lebender Tuberkelbacillen vom Typus humanus. Das Tauruman ist in Glasröhrchen zu 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschmolzen, in welchen 0,02—0,04 g lebender Tuberkelbacillen enthalten sind.

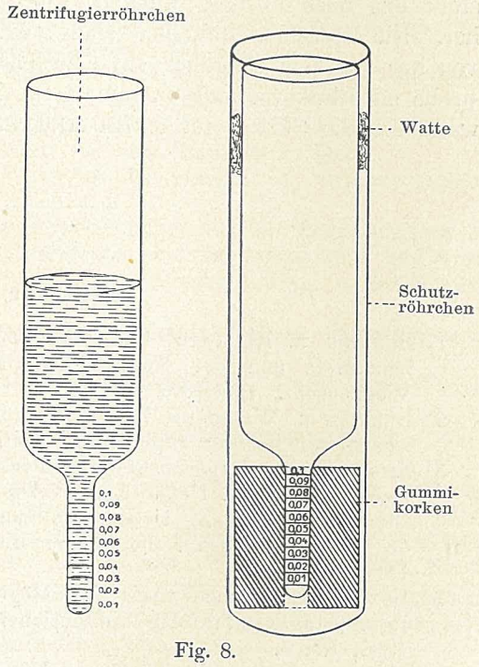


Fig. 8.

Die amtliche Prüfung besteht beim Tauruman aus einer fortlaufenden und einer periodischen Prüfung. Die letztere ist eine alle 3 Monate zu wiederholende Virulenzprüfung des Impfstoffes an Meerschweinchen und Kaninchen. Die Virulenz bezw. Avirulenz des Impfstoffes diesen Tierspecies gegenüber muß der seiner Zeit mit der Standardemulsion im Institut ermittelten entsprechen. Um dies zu prüfen erfolgt die sub-

kutane Impfung von Meerschweinchen mit 0,001 g Kultur (= 05 ccm des Impfstoffes) und die intravenöse bezw. subkutane Infektion von Kaninchen mit 0,001 bezw. 0,01 g Kultur (= 0,5 bezw. 5,0 ccm des Impfstoffes).

Die fortlaufende Prüfung des Impfstoffes erstreckt sich auf alle in den Handel gebrachten Impfstoffserien.

Da der Impfstoff möglichst frisch zur Anwendung gelangen soll, so können hier nur Prüfungen vorgenommen werden, die im Laufe weniger Tage ausführbar sind. Daher beschränkt sich diese Prüfung darauf:

1) das Präparat auf verunreinigende Bakterien zu untersuchen (das Präparat soll solche nicht enthalten) und

2) die Mengen der in jeder Impfdosis euthaltenen Bakterienmasse zu kontrollieren. Das letztere geschieht durch Bestimmung des Sediments nach scharfem halbstündigen Zentrifugieren in graduierten Zentrifugierröhrchen unter gleichzeitiger Benutzung einer Kontrollemulsion, von welcher im Institut Proben aufbewahrt werden.

Die von uns zu diesen Zentrifugierungen benötigten Röhrchen stellt uns nach unseren Angaben die Firma F. & M. Lautenschläger her. Die einzelnen Röhrchen sind möglichst präzise angefertigt und von uns vor dem Gebrauch auf Gleichmäßigkeit geprüft (Zentrifugierprobe mit Blutkörperaufschwemmung!). Ihre Gestalt und Anwendungsweise soll die Skizze (auf S. 79) erklären.

Literatur.

1) Behring u. Kitasato, Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Tieren. Dtsch. med. Wochenschr., 1890, No. 49.
2) Behring u. Wernicke, Ueber Immunisierung und Heilung von Versuchstieren bei der Diphtherie. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 12, 1892.
3) Ehrlich, P., Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Ueber Ricin. II. Ueber Abrin. Dtsch. med. Wochenschr., 1891.
4) Behring u. Knorr, Ueber den Immunisierungswert und Heilwert des Tetanusheilserums bei weißen Mäusen. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 13, 1893.
5) Bonhoff, Versuche über die Möglichkeit der Uebertragung des Rotzkontagiums mittelst Diphtherieheilserums. Berl. klin. Wochenschr., 1897, No. 5.
6) Kolle u. Otto, Vergleichende Wertprüfungen von Pestserum verschiedener Herkunft. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 40, 1902.
7) Otto, R., Das Theobald Smithsche Phänomen. v. Leuthold-Gedenkschrift. Berlin, Hirschwald, 1906.
8) Behring und Ransom, Ueber Tetanusgift und Tetanusantitoxin. Dtsch. med. Wochenschr., 1898, No. 12.

9) v. Pirquet u. Schick, Zur Theorie der Inkubationszeit. Wien. klin. Wochenschr., 1903, No. 26 u. 45.
10) — — Die Serumkrankheit. Leipzig u. Wien, Deuticke, 1905.
11) — — Ueberempfindlichkeit und beschleunigte Reaktion. Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 2.
12) Ehrlich, P., Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Klin. Jahrbuch, Bd. 6, 1897.
13) Wassermann, A., Experimentelle Untersuchungen über einige theoretische Punkte der Immunitätslehre. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 22, 1896.
14) Römer, P., Die Ehrlichsche Seitenkettentheorie und ihre Bedeutung für die medizinischen Wissenschaften. Wien (A. Hölder) 1904.
15) Ehrlich, P., Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Berlin, Aug. Hirschwald, 1904.
16) — Schlußbetrachtungen. 8. Band der speciellen Pathologie und Therapie, herausgeg. v. Hofr. Prof. Dr. A. Nothnagel. Wien 1901.
17) Pfeiffer, R. u. Marx, Die Bildungsstätte der Choleraschutzstoffe. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 37, 1898 (und Deutsche med. Wochenschr., 1898).
18) Wassermann, A., Weitere Mitteilungen über Seitenkettenimmunität, Berl. klin. Wochenschr., 1898, No. 10.
19) Deutsch, L., Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques. Annales de l'Institut Pasteur, Bd. 13, 1899.
20) Castellani, A., Ueber das Verhältnis der Agglutinine zu den Schutzkörpern. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 37, 1901.
21) v. Behring u. Boer, Die Wertbestimmung des Diphtherieheilserums. Ges. Abhdlg. z. ätiol. Ther. von anst. Krankh. 2. Teil.
22) Roux, E., Mesure de l'activité des sérums. X. Congrès internat. Paris, 1900.
23) Marx, E., Experimentelle Untersuchungen über die Beziehung zwischen dem Gehalt an Immunitätseinheiten und dem schützenden und heilenden Wert der Diphtherieheilsera. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf.-Krankh., Bd. 38, 1901.
24) Ehrlich, P., Zur Kenntnis der Antitoxinwirkung. Fortschritte der Med., 1897, No. 2.
25) — Ueber die Konstitution des Diphtheriegiftes. Dtsch. med. Wochenschrift, 1898, No. 38.
26) v. Behring, Allg. Therapie der Infektionskrankheiten. Berlin u. Wien, Urban & Schwarzenberg, 1899.
27) Martin u. Cherry, The nature of the antagonism between toxins and antitoxins. Brit. med. Journ., 1898; Proc. of the R. Society, 1898.
28) Wassermann u. Bruck, C., Ueber die Wirkungsweise der Antitoxine im lebenden Organismus. Dtsch. med. Wochenschr., 1904, No. 21.
29) Morgenroth, J., Untersuchungen über die Bindung von Diphtherietoxin u. Antitoxin zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Konstitution des Diphtheriegiftes. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 48, 1904.
30) Otto, R. u. Sachs, H., Ueber Dissociationserscheinungen bei der Toxin-Antitoxinverbindung. Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therapie, 1906.
31) v. Behring, E. Aetiologie und ätiologische Therapie des Tetanus. v. Behrings Beitr. z. exp. Therapie, 1904, Heft 7.
32) — Infektion u. Desinfektion. Leipzig (Thieme) 1894.

33) Dönitz, W., Bericht über die Tätigkeit des Kgl. Institus f. Serumforschung und Serumprüfung zu Steglitz. Jena, Gustav Fischer, 1899.
34) Madsen, Th., Ueber Messung der Stärke des antidiphtherischen Serums. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 24, 1897.
35) Ehrlich, P., Quelles sont les meilleurs méthodes pour mesurer l'activité des sérums? XIII. Congrès intern. Bruxelles, 1903.
36) Marx, E., Mitteilungen aus der prüfungstechnischen Praxis. Festschrift f. Rob. Koch. Jena, Gustav Fischer, 1903.
37) — Die Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxins. Centralbl. f. Bakt., Bd. 36, 1904.
38) Küster, E., Eine neue Saugvorrichtung für Pipetten zur genauen Abmessung kleinster Flüssigkeitsmengen. Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, 1906.
39) Rosenau, M. J., The immunity unit for Standardizing Diphtheria Antitoxin. Washington, Gov. Print. Off., 1905.
40) Dönitz, W., Die Wertbemessung der Schutz- und Heilsera. Handbuch Kolle-Wassermann IV, 2.
41) Ehrlich, Kossel u. Wassermann, Ueber Gewinnung und Verwendung des Diphtherieheilserums. Dtsch. med. Wochenschr., 1894.
42) v. Behring, E., Die Wertbestimmung des Tetanusantitoxins und seine Verwendung in der menschenärztlichen und tierärztlichen Praxis. Dtsch. med. Wochenschr., 1900, No. 2.
43) Ehrlich, P., Die staatliche Kontrolle des Diphtherieheilserums. Berl. klin. Wochenschr., 1896, No. 20.
44) Wassermann, A. u. Citron, J., Ueber die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper. Ztschr. f. Hyg. u. Inf.-Krankh., Bd. 50, 1905.
45) — Die lokale Immunität der Gewebe und ihre praktische Wichtigkeit. Dtsch. med. Wochenschr., 1905, No. 15.
46) Pfeiffer, R., Ueber die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbacillen. Dtsch. med. Wochenschr., 1894.
47) Pfeiffer, R. u. Isaeff, Ueber die spezifische Bedeutung der Choleraimmunität. Dtsch. med. Wochenschr., 1894.
48) Friedberger, E., Die bakteriziden Sera. Kolle-Wassermann IV, 2.
49) Metschnikoff, E., Etudes sur l'immunité; 6. memoire: Sur la destruction extracellulaire des bactéries dans l'organisme. Annales de l'Institut Pasteur, 1895.
50) Bordet, J., Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés. Annales de l'Institut Pasteur, 1895.
51) Marx, E., Diagnostik, Serumtherapie und Prophylaxe. Bibliothek v. Coler, Bd. 11, Berlin 1902.
52) Kutscher u. Meinicke, Vergleichende Untersuchungen über Paratyphus-, Enteritis- und Mäusetyphusbakterien und ihre immunisatorischen Beziehungen. Ztschr. f. Hyg., Bd. 52, 1906.
53) Gengou, Sur les sensibilisatrices des sérums actifs contre les substances albuminoides. Annales de l'Institut Pasteur, Tome 16, 1902.
54) Wright, E. A., Ueber die Antikörper des Streptokokken- und Pneumokokkenserums. Dtsch. med. Wochenschr., 1904, Heft 52.
55) Moreschi, C., Zur Lehre von den Antikomplementen. Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 37.
56) Neisser, M. u. Sachs, H., Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. (Ablenkung hämolytischer Komplemente.) Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 44.

57) Neisser, M. u. Sachs, H., Die forensische Blutdifferenzierung durch antihämolytische Wirkung. (II. Mitteilung.) Berl. klin. Wochenschr., 1906, Heft 3.
58) Gay, F. P., The fixation of alexines by specific serum precipitates. Centralbl. f. Bakt., 1905, No. 5 (und Annales de l'Institut Pasteur, 1905).
59) Wassermann, A. u. Bruck, C., Ist die Komplementbindung beim Entstehen spezifischer Niederschläge eine mit der Präzipitierung zusammenhängende Erscheinung oder Ambozeptorwirkung? Med. Klinik, 1905, No. 55.
60) Kolle, W. u. Wassermann, A., Versuche zur Gewinnung und Wertbestimmung eines Meningokokkenserums. Dtsch. med. Wochenschr., 1906, No. 11.
61) Nidrigailoff, Zur Frage über die Bedeutung der Fixatoren und Stimuline im bakteriziden Serum. Centralbl. f. Bakt., Bd. 41, 1906, Heft 1.
62) Denys u. Lecleff, La Cellule, 1895 (zitiert nach Bordet, s. No. 63).
63) Bordet, J., Contribution à l'étude du sérum antistreptococcique. Annales de l'Institut Pasteur, 1897.
64) Neufeld u. Rimpau, Ueber die Antikörper des Streptokokken- und Pneumokokkenserums. Dtsch. med. Wochenschr., 1904, No. 40.
65) Kolle, W. u. Wassermann, A., Untersuchungen über Meningokokken. Klin. Jahrbuch, Bd. 15, 1906.
66) Macfadyen u. Rowland, Ueber die intracellulären Toxine gewisser Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt., Bd. 35, 1904.
67) Besredka, De l'anti-endotoxine typhique et des anti-endotoxines en général. Annales de l'Institut Pasteur, 1906.
68) Wechsberg, F., Ueber bakterizide Heilsera. Wien. klin. Rundschau, 1901, No. 41.
69) Kolle, W. u. Otto, R., Weitere Untersuchungen über die Pestimmunität. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 48, 1904.
70) Neisser, M. u. Wechsberg, F., Ueber die Wirkungsart bakterizider Sera. Münch. med. Wochenschr., 1901, No. 18.
71) Marx, E., Die Wertbestimmung des Schweinerotlaufserums. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 1901, No. 6.
72) Pfeiffer, R. u. Kolle, Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Typhus abdominalis. Dtsch. med. Wochenschr., 1896.
73) Macfadyen, A. u. Rowland, S., Upon the intercellular constituents of the typhoid bacillus. Centralbl. f. Bakt., Bd. 34, 1904, H. 7/8.
74) Besredka, Études sur le bacille typhique et le bacille de la peste. Annales de l'Institut Pasteur, T. 19, 1905.
75) Dönitz, W., Ueber die Grenzen der Wirksamkeit des Diphtherieheilserums. Arch. pharmacodynam., T. 5, 1899.
76) Lazarus, Ueber antitoxische Wirkung des Blutserums Cholera-Geheilter. Berl. klin. Wochenschr., 1892, No. 43 u. 44.
77) Isaeff, Untersuchungen über die künstliche Immunität gegen Cholera. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 16, 1894.
78) Sobernheim u. Jacobitz, Ueber die Wirkungsweise und Wirkungsgrenze der antibakteriellen Heilsera. Berl. klin. Wochenschr., 1904, No. 26 u. 27.

79) Wolff, A., Ueber Grundgesetze der Immunität. Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, 1905.
80) Lorenz, Schutzimpfversuche gegen Schweinerotlauf. Dtsch. Ztschr. für Tiermedizin u. vergl. Pathologie, Bd. 21, 1895. (Centralbl. f. Bakt., 1896.)
81) Voges, O. u. Schütz, W., Ueber Impfungen zum Schutze gegen den Rotlauf der Schweine und zur Kenntnis des Rotlaufbacillus. Ztschr. f. Hyg., Bd. 28, 1898.
82) Aronson, H., Untersuchungen über Streptokokken- und Antistreptokokkenserum. Berl. klin. Wochenschr., 1902, No. 42 und 43.
83) — Diskussionsbemerkungen zum Vortrage F. Meyers über Streptokokkenheilserum. Dtsch. med. Wochenschr., 1903, No. 25.
84) Wassermann u. Ostertag, Ueber polyvalente (multipartiale) Sera mit besonderer Berücksichtigung der Immunität gegenüber den Erregern der Schweineseuche. Ztschr. f. Hyg., Bd. 47, 1904.
85) Dönitz, W., Untersuchungen über die Wertbestimmung des gewöhnlichen Tuberkulins. Klin. Jahrb., Bd. 7, 1898.
86) Koch, R., Weitere Mitteilungen über das Tuberkulin. Dtsch. med. Wochenschr., 1891, No. 43.
87) v. Lingelsheim, Ueber die Wertbestimmung der Tuberkulosegiftpräparate. Dtsch. med. Wochenschr., 1898, No. 37.
88) Neufeld, F., Zur Wertbestimmung von Tuberkulosegiftpräparaten durch intracerebrale Injektion. Dtsch. med. Wochenschr., 1899, No. 13.
89) Otto, R., Prüfungstechnische Erfahrungen bei der Wertbestimmung des Tuberkulins. Klin. Jahrb., Bd. 13, 1904.
90) Koch, R., Schütz, Neufeld u. Miessner, Ueber die Immunisierung von Rindern gegen Tuberkulose. Ztschr. f. Hyg., Bd. 51, 1905.
91) Kraus, R. u. Schiffmann, Zur Frage der Bildungsstätte der Antikörper. Wien. klin. Wochenschr., 1905, No. 40.
92) Shiga, Studien über die epidemische Dysenterie in Japan, unter besonderer Berücksichtigung des Bacillus dysenteriae. Dtsch. med. Wochenschr., 1901, No. 43, 44, 45.
93) v. Dungern, Die Antikörper. Jena, Gustav Fischer, 1902.
94) Levaditi, C., Antitoxische Prozesse. Jena, Gustav Fischer, 1905.
95) Bruck, C., Ueber die Bindungsverhältnisse von Toxin und Antitoxin im homologen Organismus. Ztschr. f. Hyg., Bd. 49, 1905.
96) Wassermann u. Citron, Zur Bildung der bakteriellen Angriffsstoffe im lebenden Organismus. Dtsch. med. Wochenschr., 1905, No. 28.
97) Bettencourt, citiert nach Kolle-Wassermann (No. 60).
98) Kitt, Th., Immunität und Schutzimpfungen bei Geflügelcholera. Kolle-Wassermann, IV, 2.
99) Dieudonné, Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie. Leipzig, Ambr. Berth, 1905.
100) Sobernheim, Immunität bei Milzbrand. Handbuch Kolle-Wassermann, IV, 2.
101) v. Lingelsheim, Immunität bei Tetanus. Kolle-Wassermann, IV, 2.
102) Ehrlich, P., Die Giftkomponenten des Diphtherietoxins. Berl. klin. Wochenschr., 1903, No. 35—37.
103) Neufeld u. Töpfer, Hämolytische und hämotrope Sera. Centralbl. f. Bakt., Bd. 38, 1905.
104) Knorr, A., Experimentelle Untersuchungen über die Grenzen der Heilungsmöglichkeit durch Tetanusheilserum. Habilitationsschr. Marburg 1895.

105) Bronstein, Zur Technik der Serumgewinnung. Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, 1906.
106) Bruck, C., Wesen, Bedeutung und experimentelle Stützen der Ehrlichschen Seitenkettentheorie. Berlin, Mod. ärztl. Bibliothek, 1906.
107) Ehrlich u. Wassermann, Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für öffentliche Gesundheitspflege in Berlin. Hyg. Rundschau, 1894, No. 2.
108) Aronson, H., Die Grundlagen und Aussichten der Serumtherapie. Berliner Klinik, 1893, Heft 63.
109) Friedberger u. Moreschi, Ueber Rassendifferenzen von Typhusstämmen. Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 45.
110) v. Behring, Die ätiologisch-therapeutischen Bestrebungen der Gegenwart. Dtsch. med. Wochenschr., 1893.
111) Berichte über die Wertbestimmung des Pariser Pestserums. Klinisch. Jahrb., 1902.
112) Töpfer u. Jaffé, Untersuchungen über die Beziehungen von Bakterizidie in vitro und im Tierversuch an Typhus- und Paratyphusbacillen mit verschiedenen spezifischen Serumproben. Ztsch. f. Hyg., Bd. 52, 1906.
113) Löffler u. Abel, Ueber die spezifischen Eigenschaften der Schutzkörper im Blute typhus- und coli-immuner Tiere. Centralbl. f. Bakt., Bd. 19, 1896.
114) Pfeiffer, R., Weitere Untersuchungen über die spezifischen Antikörper der Cholera. Ztschr. f. Hyg., Bd. 20, 1895.
115) Leclainche u. Morel, La sérotherapie de la septicémie gangréneuse. Annal. de l'Institut Pasteur, 1901, No. 1.
116) Besserer, A. u. Jaffé, J., Ueber Typhuskulturen, die sich den Immunitätsreaktionen gegenüber atypisch verhalten. Deutsche med. Wochenschr., 1905, No. 51.
117) Pfeiffer, R. u. Kolle, W., Ueber die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbacillen. Ztschr. f. Hyg., Bd. 21, 1896.
118) Neisser, M. u. Wechsberg, F., Ueber eine neue einfache Methode zur Beobachtung von Schädigungen lebender Zellen und Organismen (Bioskopie). Münch. med. Wochenschr., 1900, No. 37.
119) Knorr, A., Das Tetanusgift und seine Beziehungen zum tierischen Organismus. Münch. med. Wochenschr., 1898, No. 11 u. 12.
120) Gay, F. P., La déviation de l'alexine dans l'hémolyse. Annales de l'Institut Pasteur, 1905, No. 10.
121) Schubert, Versuche über Wertbemessung des Sobernheimschen Milzbrandserums. Inaug.-Diss. Gießen 1903.
122) Bail, O., Untersuchungen über Typhus- und Choleraimmunität. Arch. f. Hyg., 1905, Bd. 52.
123) Wernicke, E., Die Immunität bei Diphtherie. Kolle-Wassermann, IV, 2.
124) Joest, E., Immunität bei Schweineseuche und Schweinepest. Kolle-Wassermann, IV, 2.
125) Neufeld, F. u. Rimpau, W., Weitere Mitteilung über die Immunität gegen Streptokokken und Pneumokokken. Ztschr. f. Hyg., Bd. 51, 1905.
126) Dönitz, W., Ueber das Antitoxin des Tetanus. Dtsch. med. Wochenschrift, 1897, No. 27.

127) v. Behring u. Boer, Ueber die quantitative Bestimmung von Diphtherieantitoxinlösung. Dtsch. med. Wochenschr., 1894.
128) Aschoff, Ehrlichs Seitenkettentheorie und ihre Anwendung auf die künstlichen Immunisierungsprozesse. Jena 1902.
129) Sachs, H., Die Hämolysine und ihre Bedeutung für die Immunitätslehre. Wiesbaden, Bergmann, 1902.
130) Metschnikoff, E., Immunität bei Infektionskrankheiten. (Deutsch von E. Meyer.) Jena (Gustav Fischer) 1902.
131) Preisz, H., Immunität beim Rotlauf der Schweine. Kolle-Wassermann, IV, 2.
132) Shiga, K., Ueber die Priorität der Entdeckung des Ruhrbacillus und der Serumtherapie bei Dysenterie. Dtsch. med. Wochenschr., 1903, Heft 7.
133) Wright, A. E. u. Douglas, St. R., Experimentelle Untersuchungen über die Rolle der flüssigen Blutbestandteile bei der Phagocytose. (Aus den Abhandlungen der Royal Society, Vol. 72.). Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 35, 1904.
134) Michaelis, L., Die Bindungsgesetze von Toxin und Antitoxin. Berlin, Gebr. Bornträger, 1905.
135) Rosenau, M. J. and Anderson, John F., A study of the cause of sudden death following the injection of horse serum. Washington 1906.
136) Dönitz, Wertbestimmung des Tuberkulins. Handb. Kolle-Wassermann, IV.
137) Salge, Ueber den Durchtritt von Antitoxin durch die Darmwand des menschlichen Säuglings. Jahrb. f. Kinderheilk. u. s. w., N. F. No. 60, Heft 1.
138) Uffenheimer, A., Experimentelle Studien über die Durchgängigkeit der Wandungen des Magen-Darmkanals neugeborener Tiere für Bakterien und genuine Eiweißstoffe. Arch. f. Hyg., Bd. 55, H. 1/2.
139) Siegert, Referat in der Münch. med. Wochenschr., 1904.
140) Vaillard, L. et Dopter, Ch., Le sérum antidysentérique. Annal. de l'Inst. Pasteur., 1906, No. 5.
141) Bordet et Gengou: Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des Sérums antimicrobiens. Annales de l'Inst. Pasteur, 1901, No. 5.

Druckfehlerberichtigungen.

Seite 27, Zeile 18 von oben lies: „Diphtherienormalserum" (statt „Diphtherieserum").
Seite 57, Zeile 7 von oben lies: Serumdosis (statt „Dosis").
Seite 61, Zeile 3 von oben muß es heißen: ferner Kraus [1]) und Dörr [vergl. Wien. Klin. Woch. 1906 No. 30], (statt und in neuerer Zeit Kraus [1]).

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 3062

008870140135 LANGEN 2 C 365
10.12.03
Buchbinderei
www.Buchbinderei-Brand.de
Tel.: 06462 / 5581