ARBEITEN

AUS DEM

KÖNIGLICHEN INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE ZU FRANKFURT A. M.

HERAUSGEGEBEN VON

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

Heft 5.

(AUS DER PRÜFUNGSTECHNISCHEN ABTEILUNG):

K. E. Boehncke, Ueber die Haltbarkeit des Diphtherie- und Tetanusserums.

K. E. Boehncke, Die Wertbemessung des Meningokokkenserums vom prüfungstechnischen Standpunkt.

K. E. Boehncke und J. Mouriz-Riesgo, Ueber den Parallelismus der Pneumokokkenantikörper in vitro und in vivo und ihre Haltbarkeit im Pneumokokkenserum.

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1913

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Arbeiten aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. Herausgegeben von Geh. Med.-Rat Prof. Dr. **P. Ehrlich.**

1. Heft: **Aus der Abteilung für Krebsforschung.** Mit 6 Tafeln. 1906. Preis: 9 Mark.

Inhalt: I. **Die epithelialen Geschwülste der Maus.** Von Dr. Hugo H. Apolant. Mit 4 Tafeln. — II. **Ueber ein transplantables Chondrom der Maus.** Von Prof. Dr. P. Ehrlich. Mit 1 Tafel. — III. **Experimentelle Karzinomstudien an Mäusen.** Von Prof. Dr. P. Ehrlich. Mit 1 Tafel.

2. Heft: **Aus der prüfungstechnischen Abteilung.** Mit 8 Figuren. 1906. Preis: 3 Mark.

Inhalt: **Die staatliche Prüfung der Heilsera.** Von Stabsarzt Dr. R. Otto, Mitglied des Kgl. Instituts für exp. Therapie zu Frankfurt a. M. Mit 8 Figuren.

3. Heft: **Aus der experimentell-biologischen Abteilung:** Dr. H. Sachs. Mit 1 lithogr. Tafel und 4 Abbildungen im Text. 1907. Preis: 3 Mark.

Inhalt: I. **Ueber das Zusammenwirken mehrerer Ambozeptoren bei der Hämolyse und ihre Beziehungen zu den Komplementen.** Von Dr. H. Sachs und Dr. J. Bauer. Mit 1 lithogr. Tafel. — II. **Beiträge zur Kenntnis der hämolytischen Komplemente.** Von Dr. Rudolf Hecker, Privatdozent an der Universität München. Mit 4 Abbildungen. — III. **Beitrag zur biologischen Eiweißdifferenzierung.** Von W. Rickmann, Kaiserl. Veterinärarzt in Deutsch-Südwestafrika. — IV. **Ueber die Spezifität der biologischen Eiweißdifferenzierung.** Von Dr. J. Bauer, Assistenzarzt an der akademischen Kinderklinik zu Düsseldorf. — V. **Ueber die Differenzierung des Eiweißes in Gemischen verschiedener Eiweißarten.** Von Dr. H. Sachs und Dr. J. Bauer.

4. Heft: **Bakteriologisch-hygienische Abteilung:** Prof. Dr. Max Neißer. Mit 14 Abbildungen. 1908. Preis: 2 Mark 50 Pf.

Inhalt: **Ueber Opsonine und Leukostimulantien.** Von Prof. Dr. M. Neißer und Prof. Dr. Guerrini (aus Mailand). — **Fütterung von Mäusen mittelst Magensonde.** Von Dr. L. H. Marks (aus New Orleans), früheren Assistenten der Abteilung. Mit 4 Abbildungen. — **Fütterungsstudien von Mäusen mit einem Bacillus der Paratyphusgruppe.** Von demselben. — **Zur Technik der Widalschen Reaktion.** Von demselben. Mit 2 Abbildungen. — **Ein Abstich- und Zählapparat für Bakterienkolonien.** Von Prof. Dr. M. Neißer. Mit 4 Abbildungen. — **Ueber einen anfangs atypischen Typhusstamm.** Von T. Ernst, früheren Assistenten der Abteilung. — **Kasuistische Beiträge zum Vorkommen von Bazillen der Paratyphus- (Hog-Cholera-)Gruppe** Von Dr. Eckersdorff, früheren Assistenten der Abteilung. — **Weiteres zur Schardingerschen Reduktionsprobe.** Von Dr. Siegfried Oppenheimer, Frankfurt a. M. — **Ueber zwei Hausapparate zur Ozonisierung von Wasser.** Von Prof. Dr. M. Neißer. Mit 4 Abbildungen.

Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Von Wirkl. Geh. Ober-Med.-Rat Prof. **P. Ehrlich.** 1897. Preis: 80 Pf.

Betrachtungen über den Mechanismus der Ambozeptorwirkung und seine teleologische Bedeutung. Von Dr. **P. Ehrlich.** (Abdruck aus der Festschrift zum 60. Geburtstage von Robert Koch.) 1903. Preis: 60 Pf.

Jahresbericht über die Ergebnisse der Tuberkuloseforschung 1910. Von Chefarzt Dr. **F. Köhler,** Heilstätte Holsterhausen bei Werden a. d. R. (Abdruck aus dem „Klin. Jahrb.", Herausgeg. von Dr. Naumann, Wirkl. Geh. Ob.-Reg.-Rat und Ministerialdirektor, und Prof. Dr. M. Kirchner, Geh. Ob.-Med.-Rat und vortr. Rat. Band 25.) 1911. Preis: 2 Mark 50 Pf.

Jahresbericht über die Ergebnisse der Tuberkuloseforschung 1911. Von Dr. **F. Köhler,** Chefarzt der Heilstätte Holtershausen bei Werden (Ruhr). Abdruck aus „Klinisches Jahrbuch", Band 26.) 194 S. gr. 8°. 1912. Preis: 6 Mark.

Epidemische Kinderlähmung. Bericht des Komitees für die Sammelforschung bei der New Yorker Epidemie von 1907. Autorisierte deutsche Ausgabe von Dr. **Max Kärcher,** Assistenzarzt an der medizinischen Universitätspoliklinik in Bonn. Mit einleitenden und ergänzenden Bemerkungen von Dr. Paul Krause, o. ö. Professor an der Universität Bonn, Direktor der medizinischen Poliklinik. Mit 3 Tafeln, 3 Kurven und 4 Uebersichtskarten. 1910. Preis: 4 Mark.

ARBEITEN

AUS DEM

KÖNIGLICHEN INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE ZU FRANKFURT A. M.

HERAUSGEGEBEN VON

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

Heft 5.

(AUS DER PRÜFUNGSTECHNISCHEN ABTEILUNG):

K. E. Boehncke, Ueber die Haltbarkeit des Diphtherie- und Tetanusserums.

K. E. Boehncke, Die Wertbemessung des Meningokokkenserums vom prüfungstechnischen Standpunkt.

K. E. Boehncke und J. Mouriz-Riesgo, Ueber den Parallelismus der Pneumokokkenantikörper in vitro und in vivo und ihre Haltbarkeit im Pneumokokkenserum.

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1913

Uebersetzungsrecht vorbehalten.

Ueber die Haltbarkeit des Diphtherie- und Tetanusserums

Von

K. E. Boehncke

Nicht selten stößt man in ärztlichen Kreisen auf die Meinung, daß der spezifische Wertgehalt der Heilsera äußerst labiler Natur sei. Bei der erheblichen praktischen Bedeutung, die eine mehr oder minder große Haltbarkeit jedes Heilserums unbestritten besitzt, mußten Ergebnisse aus Untersuchungen über diese Frage von allgemeinerem Interesse sein. Für das am meisten angewendete Heilserum: das Diphtherie-Antitoxin sind solche Untersuchungen bereits mehrfach und an verschiedenen Stellen, jedoch mit zum Teil widersprechenden Ergebnissen ausgeführt. Gerade unser Institut ist infolge des so überaus reichlichen Materials ganz besonders in der Lage, über das Vorkommen und die Höhe von Abschwächungen der im Verkehr befindlichen Diphtherie-Heilsera Auskunft zu geben. Solche Untersuchungen sind hierselbst vor einer Reihe von Jahren von Marx[1]), sowie von Otto[2]) ausgeführt. Während letzterer die Frage der Haltbarkeit der Heilsera in der tropischen und subtropischen Zone prüfte und dabei fand, daß ein Verlust von Antitoxineinheiten, der auf den Einfluß des Tropenklimas zurückzuführen gewesen wäre, nie eingetreten war, hat Marx die Haltbarkeit verschiedener Diphtheriesera, die ohne besondere Vorsichtsmaßregeln, also in einer der Praxis entsprechenden Weise aufbewahrt wurden, genauer untersucht. Er konnte zeigen, daß von den auf der prüfungstechnischen Abteilung kontrollierten Diphtherieseris nur eine verschwindend kleine Menge (von 1104 Prüfungsnummern 34) wegen einer Abschwächung um mehr als 10 Proz. ihres Antitoxingehaltes vor Ablauf ihrer staatlichen (3-jährigen) Gewährsdauer zur Einziehung gelangen mußten. Weiter konnte Marx bei der Untersuchung mehrerer ungewöhnlich alter Sera, wie sie in der Praxis überhaupt nicht mehr

1) Festschrift z. 60. Geburtstag von R. Koch, 1903.
2) Arch. für Schiffs- und Trop.-Hyg., Bd. X., 1906.

vorkommen können, zeigen, daß auch diese alten $5^1/_2$- bis $6^1/_2$-jährigen Diphtheriesera noch in jeder Beziehung den Angaben über den Antitoxingehalt, den sie aufweisen sollten, entsprachen. Entgegengesetzte Resultate Chiadinis, der auf Grund der Untersuchungen von 12 Seris behauptet hatte, daß die Diphtheriesera bis zum 2. Jahre ihren Antitoxingehalt bewahren, sich dann aber fortwährend abschwächen, konnten von Marx als ungültig infolge der Anwendung einer fehlerhaften Versuchsmethodik des italienischen Autors zurückgewiesen werden.

Neuerdings sind von zwei japanischen Autoren, Hida und Mori [1]), Untersuchungen über die Haltbarkeit des Diphtherieserums angestellt, die wegen ihrer mit den Ergebnissen der früheren hiesigen Untersuchungen nicht recht in Einklang zu bringenden Resultate unser besonderes Interesse erregen und uns zu einer Wiederaufnahme dieser in praktischer Hinsicht so bedeutungsvollen Angelegenheit auffordern mußten. Hida und Mori untersuchten die Haltbarkeit verschiedener Diphtheriesera, die bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt waren. Auf Grund ihrer Untersuchungen mit 44 mehrere Monate bis mehrere Jahre (4 Monate bis 12 Jahre) alten Diphtherieseris, verkündeten sie als Ergebnis, daß das Diphtherieheilserum in einem Jahre keine Verminderung in seinem Gehalt an Antitoxineinheiten zeige, während es sich bei langjähriger Aufbewahrung nach und nach abschwäche. Ueber den Grad der Abschwächung der untersuchten Serumproben ergibt die nachstehende Tabelle 1 Auskunft:

Tabelle 1.

Dauer der Aufbewahrung des Serums	Maximalabnahme der Antitoxineinheiten	Minimalabnahme der Antitoxineinheiten	Durchschnittlich
bis zu 1 Jahre	0 Proz.	0 Proz.	0 Proz.
„ „ 2 „	15,3 „	0 „	5 „
„ „ 3 „	15,3 „	7,6 „	9,5 „
„ „ 4 „	30,7 „	7,6 „	26,8 „
„ „ 5 „	23,0 „	7,6 „	15,3 „
„ „ 6 „	21,0 „	8,3 „	15,1 „
„ „ 7 „	61,5 „	23,0 „	48,6 „
über 8 „	72,0 „	20,0 „	38,1 „

Aus den vorstehend wiedergegebenen durchschnittlichen Ergebnissen schlossen die japanischen Autoren auf eine ziemlich regelmäßige, gradatim erfolgende und sehr erhebliche Abnahme der antitoxischen Fähigkeiten des Diphtherieserums unter gewöhnlichen Verhältnissen. Es standen somit diese Behauptungen in sichtlichem Widerspruch zu den von Marx an dem Material unserer prüfungstechnischen Abteilung vor Jahren erhobenen und oben kurz mitgeteilten Befunden.

1) Saikingakkuzashi, 1911, No. 184, bezw. Referat in Zeitschr. für Chemotherap., 1912, II. Teil, No. 3 u. 4.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich zunächst auf die Nachprüfung des antitoxischen Wertgehalts einer Reihe zum Teil recht alter Diphtheriesera aus verschiedenen Herstellungsstätten, weiterhin auf die Nachuntersuchung mehrerer Diphtheriesera neueren Datums, die verschiedene Zeit — 1 bis 5 Monate — der schädigenden Wirkung höherer Temperaturgrade (teils 37, teils 40° C) ausgesetzt waren und endlich auf die Frage, ob unter den jetzigen gesetzlichen Bestimmungen für die Kontrolle der Diphtherie- und Tetanussera aus der Benutzung zu alter Sera irgend eine Schädigung von Aerzten und Patienten erwachsen könnte.

Die Untersuchung der Diphtherieserumproben geschah in der von Ehrlich [1]) angegebenen, in Deutschland zur staatlichen Prüfung vorgeschriebenen Gift-Serum-Mischungsmethode in vitro und Auswertung an Meerschweinchen. Die einzelnen Proben waren unseren Beständen wahllos entnommen und waren in den vergangenen Jahren ohne besondere Sicherheitsmaßregeln im Schrank eines Laboratoriums aufbewahrt, das im Winter nicht geheizt wird. In den folgenden Zusammenstellungen (Tabelle 2 und 3) ist das jeweilige Zulassungsdatum der einzelnen Serumproben, ihr ursprünglich festgestellter Mindestgehalt an Antitoxineinheiten, sowie die bei den jetzigen Nachuntersuchungen ermittelte Abschwächung gegenüber dem ursprünglichen Titer in Prozenten angegeben.

Tabelle 2.

1. Nachuntersuchung von Diphtherieseris verschiedensten Alters derselben Herkunft.

Datum der Zulassung	Ursprünglich angegebener Wertgehalt	Jetziger Wertgehalt	Abschwächung in Proz.
vor 15 Jahren	250fach	mehr als 225fach	knapp 10 Proz.
„ $14^1/_2$ „	250 „	„ „ 225 „	„ 10 „
„ $13^1/_4$ „	250 „	genau 225 „	10 „
„ $12^1/_4$ „	500 „	gut 500 „	0 „
„ $11^1/_2$ „	400 „	reichlich 400 „	0 „
„ 10 „	400 „	„ 400 „	0 „
„ 9 [2]) „	400 „	genau 300 „	25 „
„ 8 „	400 „	reichlich 400 „	0 „
„ 7 „	400 „	„ 400 „	0 „
„ $6^1/_4$ „	400 „	„ 400 „	0 „
„ $5^1/_4$ „	400 „	„ 400 „	0 „
„ 4 „	400 „	„ 400 „	0 „
„ 3 „	500 „	„ 500 „	0 „
„ 2 „	500 „	„ 500 „	0 „

1) Ehrlich: Klin. Jahrbuch, 1897. VI. Bd.; Vergl. auch Otto und Boehncke: Die Wertbemessung der Schutz- und Heilsera. Handbuch von Kolle u. v. Wassermann, 2. Aufl., II. Bd., 1. Teil.

2) Serum trübe, eingedickter Rest in der Flasche, stark bakteriell verunreinigt.

Tabelle 3.
2. Nachuntersuchung von Diphtherieseris verschiedensten Alters anderer Herkunft wie in 1.

Datum der Zulassung	Ursprünglich angegebener Wertgehalt	Jetziger Wertgehalt	Abschwächung in Proz.
vor 14 Jahren	300 fach	ca. 220 fach	ca. 27 Proz.
„ 12 „	450 „	„ 390 „	„ 13 „
„ 11 „	300 „	„ 270 „	„ 10 „
„ 10 „	250 „	„ 245 „	knapp 2,5 „
„ 9 „	400 „	360 „	„ 10 „
„ 8 „	400 „	380 „	„ 5 „
„ 6 „	500 „	über 475—480 fach	„ 5 „
„ 4 „	400 „	400 fach	0 „
„ 3 „	400 „	400 „	0 „

Ein Vergleich der in vorstehenden Tabellen ermittelten Werte mit denen der Tabelle 1 läßt ohne weiteres die großen Unterschiede unserer Untersuchungsergebnisse mit denen von Hida und Mori erkennen und beweist, daß die Annahmen dieser Autoren von der Gleichmäßigkeit und Intensität des Antitoxinverlustes im Diphtherieserum jedenfalls nicht uneingeschränkt für alle Diphtheriesera gelten können. Die ältesten von Hida und Mori untersuchten Diphtheriesera waren 8 Jahre lang aufbewahrt. Sie zeigten im Durchschnitt eine Abschwächung von 38,1 Proz. Unsere Untersuchungen ergaben für ein 8-jähriges Serum teils überhaupt keine (Tabelle 2), teils eine Abschwächung von 5 Proz. (Tabelle 3). Noch bis zu $12^1/_4$ Jahren ließ sich ein Antitoxinverlust bei Diphtherieseris einer Fabrikationsstätte nicht feststellen. 13—15-jährige Diphtheriesera derselben Fabrik zeigten einen relativ minimalen Verlust von 10 Proz. des ursprünglich angegebenen Wertgehalts. Auch die in Tabelle 3 aufgeführten Sera anderer Herkunft ließen eine erhebliche Abnahme des Antitoxingehalts erst bei einer 14-jährigen Probe erkennen. Daß die Haltbarkeit der in Tabelle 3 verzeichneten Diphtheriesera nicht ganz so gut war wie die in der Tabelle 2 verzeichneten Sera, läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß bei letzteren die Fläschchen fast durchweg mit Gummistopfen, bei ersteren dagegen nur mit Korkstopfen in Pergamenthülle verschlossen waren. Dafür würde weiter sprechen die Tatsache, daß seit der vor 8 Jahren in der betr. Fabrik durchweg eingeführten Gummistopfung (zufolge freundlicher persönlicher Mitteilung des betr. Abteilungsvorstehers Prof. Ruppel) die Diphtheriesera einen Antitoxinverlust nicht erkennen ließen. Der in Anbetracht unserer übrigen Untersuchungsresultate außergewöhnlich hohe antitoxische Verlust eines 9-jährigen Diphtherieserums (Tabelle 2) läßt sich wohl ohne weiteres auf die in diesem Falle nachgewiesene bakterielle Verunreinigung zurückführen. Aber auch die japanischen Resultate scheinen die verallgemeinernde Annahme eines ständig fortschreitenden Antitoxinverlustes in erheblichem Grade aus dem Diphtherieserum nicht ganz zu rechtfertigeu, da dieser Annahme die in der 3. Spalte der

Tabelle unter Minimalabnahme der Antitoxineinheiten verzeichneten Resultate direkt widersprechen. Es zeigt hier ein 8-jähriges Diphtherieserum nur einen Antitoxinverlust von 20 Proz., ein 6-jähriges nur von 8,3 Proz. Das dürfte dafür sprechen, daß es sich bei den untersuchten Diphtherieseris mit Maximalabnahme an Antitoxineinheiten nicht um einen natürlichen Vorgang handelt, der bei jeder längeren Konservierung jedes Diphtherieserums eintritt, sondern daß dabei noch andere Momente direkt schädigender Natur mitgewirkt haben, wie z. B. bei unserem 9-jährigen Serum in Tabelle 2. Dann kann man aber nicht mehr von einer natürlichen Abnahme des Antitoxingehalts unter den gewöhnlichen Verhältnissen der Praxis reden, und so eingreifend schon äußerlich veränderte bezw. geschädigte Sera wird niemand auch nur im Notfall gebrauchen.

Es dürfte danach die Annahme zu Recht bestehen, daß bei guter Füllung[1]) und festem Verschluß der Fläschchen (wie ihn die jetzt allgemein gebräuchlichen sterilen Gummi- bezw. paraffinierten Korkstopfen oder zugeschmolzenen Glasampullen hinlänglich sicher gewährleisten) das in Deutschland nach staatlicher Kontrolle in Verkehr gebrachte Diphtherieserum, wenn es nicht direkten Schädigungen durch Licht oder Wärme ausgesetzt ist, im allgemeinen eine praktisch unbegrenzte Haltbarkeit mit anscheinend ganz geringem, sehr allmählichem Antitoxinverlust hat, sodaß der ursprünglich garantierte Wertgehalt dem Konsumenten viele Jahre hindurch gewährleistet erscheint. Diese Erfahrungen haben wir an allen von uns kontrollierten Seris verschiedener Herkunft mit nur geringen Unterschieden gemacht bis auf eine Ausnahme. Aus einer Fabrik stammende Diphtheriesera und zwar merkwürdigerweise in der Regel gar nicht so hochwertige (meist 350fache) zeigen nämlich sehr häufig einen stärkeren Antitoxinverlust, oft schon nach wenig (6—7) Monaten. Wir kommen noch weiter unten, gelegentlich der Besprechung der gesetzlich angeordneten 6- und 24-monatlichen Nachprüfung des Diphtherieserums darauf zu sprechen. Jedenfalls müssen wir aber das Verhalten dieser Sera, die im Gegensatz zu allen anderen in Deutschland fabrizierten Diphtherieseris einen starken Antitoxinverlust schon nach kürzerer Zeit erkennen lassen, als ein ausnahmsweises betrachten, das vielleicht durch irgendwelche besondere Behandlung bei der Herstellung des Serums bedingt ist.

Die Diphtheriesera derselben Herkunft erwiesen sich übrigens ferner bei Konservierung bei höheren Temperaturen auch nur wenig haltbar, wieder im Gegensatz zu den Ergebnissen mit unseren übrigen Diphtherieseris. Denn bei diesen vermochte selbst mehrmonatige Aufbewahrung bei erhöhter Temperatur regelmäßig nur eine sehr allmähliche

1) Vermeidung der oxydierenden Wirkung eines größeren Luftquantums und geringere Gefahr bakterieller Verunreinigung.

und erst bei relativ hohen Temperaturen eintretende Schädigung zu bewirken. Wie Tabelle 4 unter a zeigt, halten 3 verschiedene Sera eine $2^1/_2$—5-monatige Erwärmung auf 37° ohne nennenswerte Einbuße an Antitoxin aus. Selbst bei einer Temperatur von 41° macht sich erst nach mehrmonatiger Einwirkung (Tabelle 5 unter a) im allgemeinen eine deutliche Abschwächung bemerkbar.

Tabelle 4.
Aufbewahrung mehrerer Diphtheriesera verschiedener Herkunft bei 37°.

	1 Monat		$2^1/_2$ Monate		5 Monate	
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
a.	reichl. 500 „ 500 „ 500	reichl. 500 „ 500 „ 500	reichl. 500 „ 500 „ 500	reichl. 500 „ 500 „ 500	reichl. 500 „ 500 „ 500	gut 500 „ 500 „ 500
b.	reichl. 350 „ 350	ca. 300 „ 325	reichl. 500 „ 350	gut 425 ca. 225	reichl. 500 —	zw. 350—400 I. E. —

Tabelle 5.
Aufbewahrung mehrerer Diphtheriesera verschiedener Herkunft bei 40°.

	1 Monat		$2^1/_2$ Monate		5 Monate	
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
a.	reichl. 500 „ 500 „ 400 „ 500	reichl. 500 „ 500 „ 400 „ 500	reichl. 500 „ 500 „ 400 —	reichl. 500 „ 500 gut 400 —	reichl. 500 „ 500 — —	knapp 500 ca. 480 — —
b.	reichl. 350 „ 350 „ 350	ca. 300 „ 300 „ 315—320				

Demgegenüber ist die starke Abschwächung der unter b. in den beiden Tabellen aufgeführten Diphtheriesera aus der vorerwähnten Fabrik besonders auffällig, zumal sie schon bei 37° nach kurzer Zeit deutlich und nach $2^1/_2$ Monaten sehr erheblich ist. Ebenso labil wie gegenüber der alleinigen zeitlichen Einwirkung (ohne schädigende Momente) verhalten sich diese selben Sera also auch der Wärmewirkung gegenüber. Es dürfte deshalb auch in diesem Fall der Schluß gerechtfertigt erscheinen, daß es sich bei diesen Diphtherieseris um eine durch irgendwelche besonderen uns unbekannten Ursachen bedingte Ausnahme von der Regel handelt.

Bisher hat uns die Frage der Haltbarkeit des Diphtherieserums bei extrem langer bezw. direkt schädlicher Aufbewahrung beschäftigt. Es erübrigt sich noch zu prüfen, wie es mit der Haltbarkeit unter den Verhältnissen der Praxis bestellt ist. Dafür können wir die Ergebnisse der amtlichen Nachprüfungen heranziehen. Bekanntlich werden in Deutschland alle Diphtheriesera nicht nur einmal auf ihren seitens der Herstellungsstätten angegebenen Wertgehalt kontrolliert, sondern auch später und zwar nach 6 bezw. 24 Monaten einer erneuten Nachprüfung unterworfen. Dabei werden bisher Sera mit einer Abschwächung von höchstens 10 Proz. nicht beanstandet; Diphtheriesera, die bei einer dieser Nachprüfungen einen stärkeren Antitoxinverlust zeigen, gelangen sofort zur Einziehung. Nach den Mitteilungen von Marx[1]) waren von 1895—1903 im ganzen 1104 Prüfungsnummern von Diphtherieserum in den Handel gebracht worden. Seit dem 1. 4. 1903 bis zum 31. 3. 1913 sind weiter 1585 Kontrollnummern zur Prüfung gelangt, insgesamt also 2689 Nummern. Davon wurden vorzeitig wegen Abschwächung eingezogen 176 = 6,5 Proz. Für die letzten 10 Jahre, den Zeitraum vom 1. 4. 1903 bis 31. 3. 1913, gestalten sich die Verhältnisse folgendermaßen:

Tabelle 6.

Geprüft	Wegen Abschwächung eingezogen	nach 6 Monaten	nach 24 Monaten
1585	142 = 8,9 Proz.	21	121
	Davon zwischen 1. 4. 1903 — 31. 3. 1908		
599	113 = 18,8 Proz.	19	94
	zwischen 1. 4. 1908 — 31. 3. 1913		
986	29 = 2,9 Proz.	2	27

Es geht daraus hervor, daß die Zahl der Einziehungen an sich keine sehr große gewesen ist und ferner, daß sich die Verhältnisse gerade in dem letzt vergangenen Lustrum ganz bedeutend (2,8 gegen 18,8 Proz. Einziehungen) gebessert haben. Immerhin sind die Zahlen doch so große, daß der Widerspruch zu den vorher dargelegten Nachuntersuchungsresultaten stark in die Augen springt. Betrachten wir aber näher, wie sich diese relativ hohen Einziehungsziffern wegen vorzeitiger Abschwächung des Serums zusammensetzen, so sehen wir sofort, daß es sich hier wieder fast ausschließlich um Diphtheriesera aus einer — oben bereits erwähnten — Fabrik handelt: unter den insgesamt im letzten Dezenium als abgeschwächt eingezogenen Diphtheriesera sind nämlich nicht weniger als 111 dieser Herkunft.

Davon mußten 17 bereits nach 5—7 Monaten, 94 nach 24—25 Monaten zur Einziehung gelangen. Da insgesamt 255 Kontrollnummern aus dieser Fabrik kontrolliert wurden, ist also fast die Hälfte, nämlich 43,6 Proz. wegen vorzeitigen starken Antitoxinverlustes zur Einziehung

1) l. c. Seite 5.

gelangt. Das steht aber wieder in so offensichtlichem Widerspruch zu allen Nachuntersuchungsresultaten der aus den anderen Fabriken stammenden Diphtheriesera, daß es sich nur bei diesen frühzeitig geringwertigen Diphtherieseris um eine — vorläufig noch unerklärliche — Ausnahme handeln kann. Denn nach Abzug der 255 erwähnten Kontrollnummern stellten sich die Ergebnisse so, daß von 1330 aus anderen Fabriken stammenden Diphtherieseris nur 31 (und zwar 4 nach 6 Monaten, sowie 27 nach 24 Monaten) d. s. 2,3 Proz. vor Ablauf der gesetzlichen Gewährsdauer wegen einer Abschwächung von mehr als 10 Proz. zur Einziehung gelangen mußten.

Ein Grund zur Beunruhigung von Aerzten und Patienten hinsichtlich etwaiger Schädigungen durch „verdorbenes" Diphtherieserum dürfte also keinesfalls vorliegen. Nachdem aber unsere Untersuchungen die Haltbarkeit des Antitoxins im Diphtherieserum in unerwartet hohem Grade erwiesen haben, würde es auch keinen Bedenken unterliegen, durch eine Verschärfung der Nachuntersuchungsbedingungen (etwa nach 6 Monaten auf vollen Wertgehalt, nach 24 Monaten auf eine Maximalabschwächung von 5 Proz.) die Kontrolle noch wirksamer zu gestalten, da hierbei Sera, bei denen eine ausnahmsweise schnelle Verminderung des antitoxischen Wertgehalts aus irgend einem Grunde stattfindet, sicher schon bei der ersten Nachuntersuchung zur Beanstandung und aus dem Verkehr kämen. Andererseits aber dürften im wohlbegründeten Interesse der Industrie ebensowenig Bedenken bestehen, bei der erwiesenen großen Haltbarkeit des Antitoxins die gesetzliche Gewährsfrist für Diphtheriesera von 3 auf 5, mindestens 4 Jahre, ohne die geringste Beeinträchtigung der Rechte der Konsumenten zu verlängern.

Nachdem durch Ministerialerlaß vom 10. Mai 1910 die Prüfungskontrolle des Tetanusserums gesetzlich geregelt und dabei außer der erstmaligen Prüfung auf den angegebenen Wertgehalt an Antitoxineinheiten auch eine spätere Kontrolle durch Nachprüfungen festgesetzt ist, sind wir in der Lage auch einige Angaben über die Haltbarkeit des Tetanusserums zu machen, worüber sich Mitteilungen in der Literatur unseres Wissens bisher nicht finden. Das flüssige Tetanusserum wird auf der prüfungstechnischen Abteilung bestimmungsgemäß nach 2 Jahren, das feste Serum nach 2 und 4 Jahren einer Nachprüfung auf seinen Wertgehalt unterzogen. Wird dabei eine Abschwächung von mehr als 10 Proz. gefunden, so erfolgt die sofortige amtliche Einziehung der betreffenden Kontrollnummer. Für nicht abgeschwächte flüssige Tetanussera beträgt die Gewährsdauer 3 Jahre, für feste Tetanussera, die auch bei der zweiten (vierjährigen) Nachprüfung genügen, ist die Gewährsdauer unbeschränkt.

Im Folgenden (Tabelle 7) bringen wir eine Uebersicht über unsere bisherigen Nachprüfungsergebnisse:

Tabelle 7.
Nachprüfung 2 Jahre alter Tetanussera auf ihren spezifischen Wertgehalt.

Kontroll-Nr.	Tag der Zulassung	Wert in A.-E.	Bei der Nachprüfung festgestellter Wertgehalt	Abschwächung in Proz.
160	21. 4. 10	4fach	4fach	0 Proz.
75	9. 5. 10	7 „	7 „	0 „
162	2. 5. 10	6 „	6 „	0 „
166[1])	15. 6. 10	60 „	60 „	0 „
167	21. 6. 10	6 „	knapp 6 „	fast 0 „
170	27. 6. 10	4 „	4 „	0 „
76[1])	4. 6. 10	70 „	gut 63 „	fast 10 „
77	3. 6. 10	4 „	knapp 4 „	„ 0 „
178[1])	29. 7. 10	40 „	40 „	0 „
179	2. 9. 10	6 „	6 „	0 „
184	4. 11. 10	6 „	6 „	0 „
185	4. 11. 10	6 „	6 „	0 „
190	17. 11. 10	4 „	4 „	0 „
80	3. 2. 11	9 „	nicht ganz 8,1 „	mehr als 10 „
196	21. 3. 11	6 „	6 „	0 „
2	28. 11. 10	4 „	knapp 4 „	fast 0 „
4	28. 11. 10	4 „	„ 4 „	„ 0 „
81	17. 4. 11	4 „	4 „	0 „

Danach haben von 18 untersuchten zwei Jahre alten Tetanusseris 12 ihren vollen ursprünglichen Wertgehalt bei der Nachprüfung ergeben; 4 Sera haben eine ganz minimale, praktisch völlig bedeutungslose, im fein reagierenden Tierversuch nur eben wahrnehmbare Abschwächung (fast 0, d. h. bis höchstens $^1/_2$ Proz.) gezeigt. Ein Tetanusserum, und zwar ein hochwertiges Trockenserum, hat eine deutliche Abschwächung von fast 10 Proz. und endlich ein hochwertiges flüssiges Serum sogar noch etwas mehr als 10 Proz. Abschwächung erkennen lassen. Dieses letztgenannte Serum verfiel deshalb der sofortigen Einziehung.

Wir können aus diesen Ergebnissen wohl den Schluß ziehen, daß auch die Haltbarkeit des Tetanusserums unter den Verhältnissen der Praxis (unsere nachgeprüften Sera sind ohne jegliche Vorsichtsmaßregeln aufbewahrt) eine durchaus befriedigende ist, und daß die gesetzlichen Vorschriften vollauf genügen, um das Vorhandensein von minderwertigen, weil stark abgeschwächten Tetanusseris im Verkehr auszuschließen.

1) Trockenserum.

Die Wertbemessung des Meningokokkenserums vom prüfungstechnischen Standpunkt

Von

K. E. Boehncke

Während eine große Anzahl von Autoren bei der Behandlung der epidemischen Genickstarre mit der Serumtherapie bei systematischen intralumbalen Injektionen größerer Mengen Meningokokkenserums günstige Resultate zu erzielen vermochte, sind von einigen Autoren unbefriedigende Resultate berichtet. Da in beiden Fällen die Sicherheit der Angaben durch die Namen der betreffenden Autoren völlig gewährleistet ist, so dürfte es vielleicht nicht fern liegen, den Grund für die Fehlschläge in den betreffenden, jeweils zur Anwendung gelangten Serumpräparaten zu suchen. Um die Verwendung solcher minderwertiger Sera zu verhindern und zugleich für die Beurteilung der spezifischen Serumwirksamheit sichere Grundlagen zu schaffen, ist man bekanntlich von jeher bestrebt gewesen, für jedes in die Therapie eingeführte bezw. einzuführende Heilserum eine genaue Wertbemessung zu ermitteln und in der Medizin bereits bewährte Sera der amtlichen Prüfungskontrolle zu unterstellen. Während sich eine Bestimmung des Wertgehalts bei den meisten in der Humanmedizin verwendeten Seris, besonders den antitoxischen, ohne größere Schwierigkeiten hat ermöglichen lassen, ist die Ausarbeitung einer sicheren Wertbemessungsmethode beim Meningokokkenserum von jeher auf die größten Hindernisse und Unstimmigkeiten gestoßen. Zwar sind von den verschiedenen Autoren, die sich mit der Darstellung des Genickstarreserums beschäftigten, auch Methoden zu seiner Wertbestimmung angegeben, doch gehen die Ansichten aller Sachverständigen über die geeignetste Art der Wertbemessung bisher noch durchaus auseinander. Bei dem Mangel eines einheitlich anerkannten Prüfungsmodus konnte aber eine staatliche Kontrolle des Meningokokkenserums trotz seiner fast allgemein anerkannten therapeutischen Wirksamkeit bisher nicht eingeführt werden, da ja naturgemäß das Vorhandensein einer durchaus sicher arbeitenden und Vergleiche er-

möglichenden Wertbestimmungsmethode eine conditio sine qua non für diese Maßregel bilden muß. Es schien daher durchaus erforderlich, vor Einführung eines bestimmten Prüfungsmodus vorerst die verschiedenen, von den einzelnen Autoren angegebenen Untersuchungsarten einheitlich nachzuprüfen, um danach entscheiden zu können, ob und welche Methode den besonderen Bedingungen der amtlichen Prüfungstechnik völlig bezw. am meisten gerecht wird.

Bevor wir in die Wiedergabe der hierbei erzielten Untersuchungsergebnisse eintreten, dürfte es angebracht sein, eine zusammenfassende Uebersicht der verschiedenen in der Praxis der Serumfabrikation und im Laboratorium benutzten Wertbemessungsmethoden des Meningokokkenserums voranzuschicken. Sie lassen sich trennen, in (die natürlich weit mehr vorzuziehenden, weil überzeugenderen) Versuche am lebenden Tier und in solche im Reagenzglas.

Jochmann hat trotz der ihm bekannten schwankenden Tiervirulenz der Meningokokkenstämme die Austitrierung des Meningokokkenserums im Tierversuch an weißen Mäusen oder jungen Meerschweinchen vorgenommen und hat angeblich damit „einigermaßen zufriedenstellende Wertbestimmungen“ ausführen können.

Ruppel, der sein Meningokokkenserum an weißen Mäusen auswertete, benutzte als Prüfungsstämme eine durch fortgesetzte Passage auf Serumbouillon so hoch virulent gemachte Meningokokkenkultur, daß sie noch in Dosen von 0,000001 Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse unter dem Bilde der Septikämie tötete. Jedoch haben diese Angaben Ruppels nirgends Bestätigung gefunden, da es anscheinend keinem anderen Autor gelungen ist, eine derartige Virulenzsteigerung bei Meningokokken zu erzielen.

Von Kraus und Doerr, sowie von v. Wassermann und Leuchs, ferner von Kraus und Bächer wurde vorgeschlagen, die giftneutralisierende Wirkung des Meningokokkenserums gegenüber einem als Schüttelextrakt hergestellten spezifischen Toxin zu seiner Wertbestimmung heranzuziehen. Die genannten Autoren vermochten dabei in der Prüfung an jungen Meerschweinchen angeblich quantitative Resultate zu erzielen.

Krumbein und Diehl konnten bei der Nachprüfung dieses Verfahrens weder mit den toxischen Extrakten allein, noch mit Extrakt und Serumgemischen bei der Prüfung des präventiven und kurativen Effekts des Meningokokkenserums genügend gleichmäßige Reihen erhalten. Sie haben vorgeschlagen, anstatt der labilen Meningokokkenextrakte Bakteriensedimente zu benutzen, wobei angeblich eine größere Konstanz in der toxischen Wirkung erreicht wurde.

Noch ein anderes Verfahren, daß den Tierversuch bereits mit dem Reagenzglasversuch kombiniert, ist die von Kraus und Bächer angegebene Prüfung der Bakteriotropie im Meerschweinchenperitoneum

mit gleichzeitiger intraperitonealer Einverleibung von Meningokokkenserum und Kultur und späterer Plattenaussaat des entnommenen Exsudats.

Während die Feststellung des Agglutinationstiters ziemlich einhellig als ungeeignet zur Wertbestimmung der Meningokokkensera erachtet ist, weil ein hohes Agglutinationsvermögen durchaus keinen Schluß auf die Schutz- und Heilkraft des betreffenden Serums gestattet und die Prüfung der bakteriziden Wirkung in vitro bisher zu praktischen Ergebnissen nicht geführt hat, haben zwei andere Reagenzglasmethoden namentlich in neuerer Zeit allgemeinen Anklang gefunden. Es sind dies einmal das von Kolle und von v. Wassermann angegebene Verfahren, das die quantitative Bestimmung der gegenüber einem Meningokokkenantigen komplementbindenden Stoffe des Serums in vitro bezweckt und weiter der von Neufeld ausgearbeitete bakteriotrope Reagenzglasversuch, womit ebenfalls unter Ausschaltung des Tierkörpers die jeweils kleinste Menge Meningokokkenserum festgestellt wird, die in vitro noch eine deutliche spezifische Phagozytose von Meningokokken hervorzurufen vermag.

Die Nachprüfung dieser voraufgeführten Wertbemessungsmethoden, die von der prüfungstechnischen Abteilung des Instituts im Laufe der letzten $1^1/_2$ Jahre (auf Anordnung des Herrn Ministers des Innern) vorgenommen wurde, erstreckte sich einmal auf die Erprobung des originaliter jeweils angegebenen Verfahrens und sollte weiter versuchen evtl. durch Einführung und Einfügung noch möglicher zweckdienlicher Modifikationen die eine oder andere Methode so umzugestalten, daß sie auch den besonderen Anforderungen der amtlichen Prüfungstechnik genügt.

1. Wertprüfung des Meningokokkenserums in vivo.

Zur direkten Prüfung der antiinfektiösen Wirkung des Meningokokkenserums im Tierversuch ist es vor allem nötig, Meningokokkenstämme von konstanter Virulenz für das zur Prüfung geeignetste Versuchstier ausfindig zu machen. Es genügte also für die besonderen Zwecke der amtlichen Prüfung nicht, festzustellen, daß dieser oder jener Meningokokkenstamm sich als virulent erwies, sondern es mußte weiter genauestens festgelegt werden, daß diese Tiervirulenz eine konstante, unveränderliche Eigenschaft des betreffenden Stammes war und blieb. Schon nach Jochmanns Erfahrungen, der die Austitrierung seines Genickstarreserums an weißen Mäusen infolge der „schwankenden Tiervirulenz der Meningokokkenstämme erschwert“ fand, war die Aussicht nicht groß; umso geringer als nach dem übereinstimmenden Urteil aller Autoren (Kolle und v. Wassermann, Kraus und Doerr, Flexner, Kutscher, Neufeld u. a. m.) die Jochmannsche Art der Wertbemessung mangels einer hinreichend konstanten Virulenz der

Meningokokken und eines genügend empfänglichen Versuchstieres für die Praxis nicht als brauchbar erachtet ist. Die in unseren Versuchen gewonnenen Resultate brachten eine volle Bestätigung dieser Angaben. Von ca. 25 verschiedenen Meningokokkenstämmen, darunter auch frisch aus dem Körper gezüchtete, besaß kein einziger eine nennenswerte Virulenz (nicht unter 2—3 Normalösen bei intraperitonealer Einverleibung) gegenüber weißen Mäusen und niemals ließ sich eine konstante Virulenz erweisen. Die Versuche auf Meerschweinchen auszudehnen, erübrigte sich nach den übereinstimmenden Angaben in der Literatur, daß dort die Verhältnisse ganz ähnlich wie bei den Mäusen liegen. Es kann demnach die direkte Prüfung der antiinfektiösen Wirkung des Meningokokkenserums im Tierversuch infolge der geringen und dazu schwankenden Tiervirulenz der Meningokokkenstämme für die staatliche Prüfung nicht herangezogen werden. Das gleiche gilt für die von Flexner an Affen verschiedentlich mit Erfolg ausgeführte Bestimmung der antiinfektiösen Eigenschaften eines Meningokokkenserums, da infolge der notwendigen intralumbalen Einverleibung dieses Verfahren einmal zu kompliziert und in unseren Breitengraden auch zu teuer sein dürfte und andererseits ebenfalls sehr von der Benutzung stets frisch isolierter Meningokokkenstämme abhängig zu sein scheint, die in der Praxis aber nur ausnahmsweise zu erhalten sein dürften.

Der von Ruppel eingeschlagene Weg zur Wertbestimmung des Meningokokkenserums mit künstlich hochgetriebenen Passagestämmen konnte bisher von keinem anderen Autor bestätigt werden, da mangels näherer Angaben über seine Versuche eine Kontrolle nicht möglich und es keinem anderen Untersucher (Krumbein und Schatiloff) gelungen ist, eine derartige Virulenzsteigerung — bis zu $^1/_{1000}$ Oese für weiße Mäuse — bei Meningokokken zu erzielen. Andererseits wird man wohl der Ansicht Neufelds vollkommen beipflichten müssen, daß auch im Falle der Möglichkeit einer solchen künstlichen Virulenzsteigerung eines Meningokokkenstammes es wohl den größten Bedenken unterliegen müßte, solche in ihren pathogenen Eigenschaften fundamental veränderte Passagestämme zur Serumprüfung, insbesondere für Zwecke einer allgemein gültigen amtlichen Prüfungskontrolle heranzuziehen.

Größere Aussicht für eine erfolgreiche Titrierung des Meningokokkenserums im Tierversuch schien zunächst die von Kraus und Doerr, v. Wassermann und Leuchs, sowie Kraus und Bächer vorgeschlagene, auch von Flexner, sowie Dopter bestätigte Möglichkeit der Prüfung des Serums auf seine giftneutralisierende Wirkung zu bieten. Diese Prüfung erfolgt an Meerschweinchen von 150 g (nach Kraus besser von 125 g) mit stets frisch hergestellten Giftlösungen. Diese toxischen Extrakte werden gewonnen durch Abschwemmen 24-stündiger Bakterienrasen Kollescher Schalen, die mit verschiedenen

Meningokokkenstämmen besät sind, mit je 5 ccm sterilen destillierten Wassers (v. Wassermann und Leuchs) oder durch Abschwemmen 48-stündiger Kulturen mit 10 ccm $^1/_{10}$ Normalsodalösung (Kraus und Bächer) oder aus toluolisierten, durch Berkefeldfilter filtrierten Kochsalzsuspensionen oder filtrierten Bouillonkulturen von Meningokokken (Flexner). Von einem solchen Toxin verlangt man man, daß es in Mengen von 0,1 ccm, mindestens von 0,3 ccm für Meerschweinchen von 150 g in 24 Stunden tödlich ist. Die Tiere erhalten dann die mehrfach tödliche Dosis gemischt mit fallenden Mengen des Immunserums in die Bauchhöhle injiziert.

Es zeigte sich nun zunächst, daß — wie dies auch die genannten Autoren bemerken — nicht alle Stämme in gleicher Weise zur Gewinnung eines wirksamen Toxins sich eignen, im Gegenteil scheint diese Fähigkeit nur ganz ausnahmsweise den Meningokokken zuzukommen. Uns ist es jedenfalls bei unseren zahlreichen Stämmen nie gelungen, nach den vorbeschriebenen Methoden bezw. bei Anwendung von neutralisierten Antiforminauflösungen der Kokken, ein Toxin mit akuter Giftwirkung von weniger als 0,3 ccm für 150 g Meerschweinchen bei intraperitonealer, intravenöser oder intrakardialer Injektion zu erzielen. Meist lag die Dosis letalis minima erst zwischen 0,3 bis 0,5 ccm. Abgesehen von diesem nicht gerade sehr hohen Giftwert, zeigten sich aber die Extrakte in ihrer Giftwirkung häufig sehr schwankend, so daß bereits bei der Gifteinverleibung allein die Versuchsreihen nicht entsprechend den quantitativen Verhältnissen ausfielen, noch weniger aber bei Injektion der Giftserumgemische. Deshalb lehnen auch Krumbein und Diehl die Prüfung gegen das Toxin bei Meerschweinchen wegen der starken Schwankungen in der Giftwirkung ab. Wir zogen ferner, da die Toxinprüfung an weißen Mäusen nirgends brauchbare Werte ergeben hat und auch uns nicht ergab, zur Einstellung der Toxine auch Kaninchen von 1000—1200 g Gewicht heran, um zu prüfen, ob sich hierbei vielleicht bessere Ausschläge in quantitativer Hinsicht erreichen ließen. Zur Erzielung eines akuten Todes (in 24 Stunden) machte sich eine Erhöhung der toxischen Dosis auf 0,75—1,0 ccm nötig; Dosen von 0,4—0,5 ccm (intravenös) vermochten den Tod in 4 bezw. 3 Tagen herbeizuführen. Während sich mit dem Toxin allein hinlänglich gleichmäßige Resultate erzielen ließen, traten bei Einverleibung der Giftserumgemische meist große Schwankungen auf. Außerdem machte sich stets eine erhebliche Verringerung des toxischen Effekts der Extrakte, auch bei nur wenige Wochen, ja bisweilen schon bei einige Tage währender Konservierung (karbolisiert im Eisschrank gehalten, bezw. nach Einfrieren und Wiederauftauen) bemerkbar. Das ist aber ein Uebelstand, der den Wert dieser Methode für prüfungstechnische Zwecke sehr problematisch macht, da beim Fehlen eines — wenigstens einigermaßen — konstanten Testtoxins die Austitrierung eines antitoxischen Serums auch unter Verwendung eines

Standardserums nur mit großen Fehlergrenzen geschehen kann. In Uebereinstimmung mit Kolle, der diese Prüfungsmethode für praktisch undurchführbar hält, ferner mit Krumbein und Diehl, sowie Flexner und Jobling, die zu befriedigenden Ergebnissen ebenfalls nicht gelangten, konnten auch wir uns nach den oben dargelegten Erfahrungen, von einer genügenden Sicherheit der Methode, wie sie für prüfungstechnische Zwecke unumgänglich erforderlich ist, nicht überzeugen. Ganz abgesehen davon, wird bei der Bewertung der giftneutralisierenden Wirkung des Meningokokkenserums im günstigsten Falle nur eine, dabei nach ziemlich übereinstimmenden Ansichten fast aller Autoren, wohl nicht sehr bedeutende Quote der Heilwirkung des Serums geprüft, wie ja auch im Krankheitsbilde der epidemischen Genickstarre toxische Einflüsse weniger in Erscheinung treten, als die Symptome der echten Infektionskrankheit. Trotz der erwähnten Unzulänglichkeiten dürfte die Methode aber sicher die einzige sein, die bei weiterem Ausbau, besonders durch Gewinnung eines Toxins von hohem und konstantem Giftwert im Tierversuch eine Wertbemessung des Meningokokkenserums ermöglichen lassen wird. Dabei ist weniger von Belang, daß die bisher mitgeteilten antitoxischen Werte des Meningokokkenserums nur niedrig sind (0,5 — 1,0 ccm Immunserum gegenüber der 1—2-fachen Dosis letalis minima), da einmal die antitoxische Quote bei der Herstellung des Immunserums bisher wohl nur weniger Berücksichtigung gefunden hat, andererseits aber beim Meningokokkenserum ein Hochtreiben des antitoxischen Wertgehalts, nicht wie beim Diphtherie-, Tetanus- und Dysenterieserum erstes Erfordernis ist, weil hier auf den Antitoxingehalt immerhin nur ein Teil der günstigen Wirkung des Serums zurückzuführen sein dürfte.

Anstatt der Kokkenextrakte haben Krumbein und Diehl die Verwendung von sterilisierten Kokkenemulsionen in Versuchen an Meerschweinchen und weißen Mäusen vorgezogen, da die letzteren eine bis zu 3 Monaten währende Haltbarkeit der Giftwirkung zeigten. Weder die an Meerschweinchen noch an Mäusen von den genannten Autoren erzielten Resultate erscheinen geeignet, um sie als versprechend für eine rationelle Serumprüfung bezeichnen zu können. Auch wir vermochten bei der Verwendung solcher steriler Kokkenemulsionen an weißen Mäusen keine glatten Reihen bei der Toxizitätsprüfung zu erreichen. Auch bei der Kombination von Kokkenemulsionen + Meningokokkentoxin zur Erzielung besserer toxischer Effekte waren unsere Resultate nur ausnahmsweise den einverleibten Giftquantitäten entsprechend. Bei Verwendung gleichbleibender, sicher toxischer Dosen mit fallenden Serummengen im Giftserumgemische (Einverleibung subkutan und intraperitoneal) zeigten nur relativ hohe Serumdosen (0,3—0,5 ccm pro 20 g Maus) eine Wirkung, die dann aber auch von dem zur Kontrolle injizierten Normalserum meist erreicht wurde, wie

es sich ähnlich auch in einigen Versuchen von Krumbein und Diehl zeigt. Also auch mit dieser Modifikation erscheint die Auswertung des Meningokokkenserums im Tierversuch praktisch nicht brauchbar.

Die von Kraus und Bächer angegebene Methode zum Nachweis der bakteriotropen Eigenschaften des Serums in vivo, wobei die durch Phagozytose erfolgende Keimzahlverminderung in der Peritonealhöhle von Meerschweinchen mittels nachfolgender Plattenaussaat geprüft wurde, ist zwar theoretisch sehr interessant, in praxi aber so umständlich und mit der Gefahr größerer Fehlerquellen verknüpft, daß sie sich für die prüfungstechnische Praxis weniger eignet, als der bakteriotrope Reagenzglasversuch, wie ihn übrigens zurzeit auch Kraus und Bächer selbst zur Wertbemessung anwenden.

Damit erscheinen die Möglichkeiten einer Prüfung im Tierversuch erschöpft. Da keine einzige der Methoden in der zurzeit gehandhabten Ausführung eine nur einigermaßen genügende Sicherheit der Wertbestimmung gewährleistet, so kommen sie, wenigstens in der jetzigen Form, zur Verwendung in der prüfungstechnischen Praxis nicht in Frage.

Es mußte danach weiter geprüft werden, ob die verschiedenen, zur Austitrierung des Meningokokkenserums angegebenen Reagenzglasmethoden bessere Resultate zu liefern ermöglichen.

II. Wertprüfung des Meningokokkenserums in vitro.

Während Krumbein und Diehl noch angeben, daß außer den komplementbindenden Stoffen, auch der Gehalt an Agglutininen sich bisher für die Wertbestimmung des Meningokokkenserums als brauchbar erwiesen hat, wobei sie allerdings die Komplementbindungsmethode der Agglutinationsreaktion überlegen erklären, ist sonst ganz allgemein die Prüfung des Agglutinationstiters als ungeeignet zur Wertbemessung des Meningokokkenserums erklärt worden, weil hohe Agglutinationskraft auch ohne Schutz- und Heilkraft erzeugt werden kann (Jochmann). Bächer und Hachla machen außerdem noch auf die Abhängigkeit des Agglutinationstiters von der Verwendung mehr oder weniger gut agglutinabler Stämme aufmerksam. Wir haben mit Rücksicht auf die ersterwähnte, anerkannte Tatsache von vornherein darauf verzichtet, die Agglutinationsreaktion zur staatlichen Prüfung des Meningokokkenserums heranzuziehen. Ganz abgesehen davon würde anscheinend die Verwertung des Agglutinationsresultats als Wertprüfungsmethode ein falsches Bild von der Haltbarkeit der Meningokokkensera geben. Wir fanden nämlich bei mehreren nach Jahresfrist und darüber untersuchten Meningokokkenseris eine ganz beträchtliche Abnahme der agglutinierenden Antikörper im Gegensatz zu dem noch vorhandenen Gehalt an komplementbindenden Stoffen und bakteriotropen Immunkörpern.

(Protokoll s. w. u. Seite 41.) Dieses Ergebnis lediglich mit der zufälligen Verwendung eines schlecht agglutinablen Stammes erklären zu wollen, würde aber wohl sehr gezwungen erscheinen, da die Resultate mit mehreren Stämmen die gleichen waren und bei Verwendung derselben Stämme, sowohl im Komplementbindungsversuch, wie mit dem Tropinversuch ein weit stärkerer Gehalt an spezifischen Stoffen sich nachweisen ließ.

Eine nennenswerte bakteriolytische oder bakterizide Wirkung des Meningokokkenserums hat sich — auch in Verwendung mit Komplement oder frischen Peritonealextrakt von Meerschweinchen — nie nachweisen lassen (Haendel, Kraus und Bächer, Jobling, Neufeld). Es ist deshalb auch die Bewertung des Serums nach dem Gehalt an bakteriziden Ambozeptoren von keiner Seite herangezogen worden, obschon Jochmann angibt, eine, wenn auch nur geringe bakterizide Wirkung seines Serums durch Plattenversuche nachgewiesen zu haben. In den von uns angestellten Plattenversuchen haben wir verwertbare Resultate ebenfalls nicht erzielen können.

Das von Kolle und v. Wassermann zur Wertbestimmung des Meningokokkenserums in vitro angegebene Verfahren, benutzt dazu die Bordet-Gengousche Komplementbindungsmethode und bestimmt den Gehalt des Immunserums an komplementbindenden Stoffen gegenüber einem spezifischen Antigen. Aus dem Für und Wider der zahlreichen, über die Brauchbarkeit dieser Methode zur Wertbemessung des Meningokokkenserums erschienenen Veröffentlichungen (Neufeld, Kraus und Doerr, Kraus und Bächer, Krumbein und Schatiloff, Krumbein und Diehl, Bächer und Hachla, v. Wassermann und Leuchs, Flexner und Jobling, Jochmann, Onaka, Colombo u. a. m.) läßt sich jedenfalls soviel entnehmen, daß die Methode zur Feststellung von vergleichenden Werten geeignet ist und im Ganzen für die Praxis genügend gleichmäßige Resultate ergibt, ohne freilich ganz zu befriedigen. Es war demnach zu untersuchen, ob die Methode auch für die besonderen Verhältnisse der amtlichen Prüfung ausreicht, namentlich ob die beiden Hauptkomponenten des Verfahrens: das Immunserum und das spezifische Antigen sich in prüfungstechnischer Konstanz herstellen und konservieren lassen, so daß eine ständige Gleichmäßigkeit und Vergleichsmöglichkeit der jeweils sich ergebenden Resultate gewährleistet erscheinen kann. Erst in zweiter Linie war zu berücksichtigen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen dem Komplementbindungsvermögen und der therapeutischen Wirksamkeit der Meningokokkensera sich beweisen läßt. Denn die anfängliche Meinung von Kolle und v. Wassermann, daß die komplementbindenden Stoffe mit ambozeptorartigen Substanzen zu identifizieren seien, hat sich später als nicht haltbar erwiesen (Neufeld, Flexner und Jobling, Kraus und Bächer u. a. m.) und ist auch von den beiden Autoren inzwischen selbst redressiert. Da aber bei der staatlichen Prüfungskontrolle der Modus der provisorischen (fakultativen) amtlichen Prüfung von Heilseris besteht, wonach von einer neu einzuführenden Prüfungsmethode zunächst nur quantitativ gleichbleibende Standardresultate verlangt werden, ohne Rücksicht darauf, welcher Art die dabei geprüften Stoffe sind, erscheint bei Unmöglichkeit einer anderen Wertprüfung sonach die Verwertung dieser Methode für die Zwecke der amtlichen Prüfung auch möglich, wenn nur der ersten Forderung mit ihr genügt wird, ganz abgesehen davon, daß bisher ein strikter Beweis dafür, daß die komplementbindenden Stoffe mit dem Schutz- und Heilwert des Serums in gar keiner Beziehung stehen, nicht geliefert ist.

Unsere Untersuchungen hatten sich also zunächst zu erstrecken auf die Prüfung der Konstanterhaltung 1. des Immunserums, 2. des Antigens.

Welche Konservierungsweise die Haltbarkeit der komplementbindenden Stoffe in einem als Standardserum zu verwendenden Meningokokkenserum am besten garantiert, war von vornherein nicht ganz sicher, da sich in der Literatur widersprechende Angaben über diesen Punkt fanden. So soll nach den Untersuchungen von Krumbein und Schatiloff der Titer flüssiger, karbolisierter Meningokokkensera verhältnismäßig rasch heruntergehen, aber auch in trocken konservierten Meningokokkenseris ein ständiger Rückgang an komplementbindenden Stoffen sich bemerkbar machen. Haendel und Neufeld konnten dagegen im Laufe eines Jahres keine Abschwächung feststellen. Dasselbe berichten Bächer und Hachla, und v. Wassermann und Leuchs sprechen direkt von einer prüfungstechnischen Konstanz, ohne allerdings auf die Frage der Konservierung näher einzugehen. Unsere Untersuchungen ergaben, daß die im Handel erhältlichen flüssigen Meningokokkensera unter gewöhnlichen Verhältnissen eine verschiedene Haltbarkeit der komplementbindenden Stoffe zeigen. So ließ ein karbolisiertes, im Eisschrank aufbewahrtes Meningokokkenserum (B. vom 29. 5. 1911) aus der chemischen Fabrik von E. Merck in Darmstadt und das Meningokokkenserum No. 53 vom 1. 5. 1911 (karbolisiert) aus dem Institut für Infektionskrankheiten, Robert Koch, bei der Wiederholung der Komplementbindungsreaktion nach 15 Monaten eine teils nicht unerhebliche, teils immerhin deutliche Verminderung an komplementbindenden Stoffen erkennen, wie aus nachstehendem Protokoll ersichtlich ist (Tabelle 1, Seite 26—27). Dagegen fiel bei den Meningokokkenseris No. 5 und 6 (karbolisiert) aus den Farbwerken Höchst a. M. und No. 34 und 35 aus dem Berner Seruminstitut (u. W. unkarbolisiert), die ebenfalls im Eisschrank konserviert wurden, die zweite nach 14, bezw. 15 Monaten vorgenommene Prüfung fast genau so aus wie das erste Mal (s. die betreffenden Protokolle in Tabelle 1, Seite 26—27). Bei unzweckmäßiger Aufbewahrung — im Brutschrank

Tabelle

Haltbarkeit der komplementbindenden

Im.Se.	+	Men.Extr. 1/10	+	Kompl. 1/10		Men.Se. Merck B. 21.7.11	Men.Se. Merck B. 21.10.12	Men.Se. Merck B. 21.10.12 Kons. bei 37°	Men.Se. Nr. 53 (Inst. f. Inf.) 21.7.11	Men.Se. Nr. 53 (Inst. f. Inf.) 21.10.12	Men.Se. Nr. 53 (Inst. f. Inf.) 21.10.12 Kons. bei 37°
0,25	+	0,5 1)	+	0,5	Zusatz von Hbl + Abc 2). Aufbewahrung 3) bei 37°.	H. kplt.	H. kplt.	0	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.
0,2	+	„	+	„		„	fst. kplt.	0	„	„	„
0,1	+	„	+	„		„	Spur	0	„	„	fst. „
0,05	+	„	+	„		„	fst. 0	0	„	„	0
0,01	+	„	+	„		0	0	0	fst. kplt.	Spur	0
0,005	+	„	+	„		0	0	0	„	0	0
0,002	+	„	+	„		0	0	0	Spur	0	0
0,001	+	„	+	„		0	0	0	0	0	0
0,002		—	+	„		0	0	0	0	0	0
0,005		—	+	„		0	0	0	0	0	0
0,1		—	+	„		0	0	0	0	0	0
0,2		—	+	„		0	0	0	0	0	0
0,25		—	+	„		0	0	0	0	0	0
0	+	0,5	+	„		0	0	0	0	0	0
0	+	1,0	+	„		0	0	0	0	0	0
N.Se.											
0,25	+	0,5	+	„		0	0	0	0	0	0
0,25		—	+	„		0	0	0	0	0	0
0,5		—	+	„		0	0	0	0	0	0

Eine Stunde bei 37°.

bei 37° — machte sich nach den angegebenen Zeiten ausnahmslos ein starker Rückgang an komplementbindenden Stoffen bemerkbar. (Protokolle s. vorstehende Tabelle 1). Bemerkt sei dabei, daß als Antigen in allen Versuchen derselbe Standardextrakt zur Verwendung gelangte. Derselbe stammte aus dem Institut für Infektionskrankheiten Robert Koch und wurde eingefroren konserviert. Jedenfalls zeigen die Versuche, daß die Haltbarkeit der komplementbindenden Stoffe in Meningokokkenseris, die in gleicher Weise im Eisschrank konserviert werden, keine ganz gleichmäßige ist, somit dieser Konservierungsmodus für prüfungstechnische Zwecke nicht genügen kann. Wir haben deshalb die Konservierung eines vom Sächsischen Serum-Werk im Mai 1912 uns zur Verfügung gestellten Meningokokkenserums nach der Ehrlichschen Vakuummethode vorgenommen, die sich bekanntlich (Otto, sowie Otto und

1) = der Hälfte der ersten spontan nicht mehr hemmenden Extraktdosis.
2) = der 3fach lösenden Abc.-Dosis (nach 20 Min.).
3) = Dauer der Aufbewahrung bis zur Lösung sämtlicher Kontrollen. Notierung der Resultate nach 20-stündiger Aufbewahrung im Eisschrank. In allen Röhrchen ist das Gesamtvolumen durch physiologische NaCl-Auffüllung auf 2,5 ccm gebracht.

1.

Stoffe im Meningokokkenserum.

Men.Se. Höchst Nr. 5 28.8.11	Men.Se. Höchst Nr. 5 22.10.12	Men.Se. Höchst Nr. 5 22.10.12 Kons. bei 37°	Men.Se. Höchst Nr. 6 28.8.11	Men.Se. Höchst Nr. 6 22.10.12	Men.Se. Höchst Nr. 6 22.10.12 Kons. bei 37°	Men.Se. Bern Nr. 34 21.7.11	Men.Se. Bern Nr. 34 21.10.12	Men.Se. Bern Nr. 34 21.10.12 Kons. bei 37°	Men.Se. Bern Nr. 35 21.7.11	Men.Se. Bern Nr. 35 21.10.12	Men.Se. Bern Nr. 35 21.10.12 Kons. bei 37°
H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.
„	„	„	„	„	„	„	„	fst. kplt.	„	„	„
„	„	fst. kplt.	„	„	„	„	„	0	„	„	deutl.
„	„	0	fst. kplt.	fst. kplt.	0	„	„	0	„	„	0
fst. kplt.	fst. kplt.	0	0	„	0	„	„	0	„	„	0
deutl.	deutl.	0	0	„	0	„	fst. kplt.	0	deutl.	deutl.	0
fst. 0	0	0	0	0	0	0	0	0	fst. 0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Boehncke) zur Konservierung des Diphtherie-, Tetanus-, Rotlauf- und anderer Standardsera ausgezeichnet bewährt hat. Zu diesem Zwecke wurden teils je 0,6 ccm des unkarbolisierten Meningokokkenserums in die Glasschenkel des Vakuumapparats gefüllt und im Vakuum eingetrocknet, teils wurde das Meningokokkenserum (10fach konzentriert) zu je 0,3 g in den Glasschenkeln luftfrei eingeschmolzen. Wie das Resultat der nach 7 Monaten vorgenommenen Nachprüfung ergab, hatte das Serum bei dieser Konservierung seinen Anfangstiter vollkommen behalten (s. Tabelle 2.)

Tabelle 2

Im.Se.	+	Men. Extr. 1/10	+	Kompl. 1/10	Standardisiertes flüssiges Serum 25. 5. 12	Standardisiertes flüssiges Serum 20. 12. 12	Standardisiertes trockenes Serum 13. 5. 12	Standardisiertes trockenes Serum 20. 12. 12
0,1	+	0,5	+	0,5	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.
0,05	+	„	+	„	„	„	„	„
0,02	+	„	+	„	„	„	„	„
0,01	+	„	+	„	deutl.	deutl.	„	„
0,005	+	„	+	„	Spur	Spürchen	fst. kplt.	„
0,002	+	„	+	„	0	0	Spur	Spürchen
0,001	+	„	+	„	0	0	0	0

Kontrollen, hämolytisches System, Versuchsdauer und Gesamtvolumen der einzelnen Röhrchen wie in den Versuchen auf Tabelle 1.

Natürlich müssen erst noch weitere Nachuntersuchungen die dauernde Konstanz des Meningokokkenserums bei dieser Konservierungsart beweisen. Wenn diese auch fernerhin die Konstanz des luftfrei konservierten Trockenserums ergeben sollten, so wäre aus praktischen Gründen diese Form der Aufbewahrung vorzuziehen, da bereits in einem Röhrchen mindestens die für eine Komplementbindungsreaktion erforderliche Menge Standardserum (0,3 g des 10fach konzentrierten = 3,0 ccm natives Serum) enthalten ist, während von den flüssig eingefüllten und nach Eintrocknung im Vakuum luftfrei konservierten Seris in jedem Röhrchen höchstens 0,6 ccm nativen Serums zur Verfügung stehen, also stets eine größere Zahl von Röhrchen für jeden Versuch zu öffnen wäre. Bei der Benutzung eines Standard-Trockenserums ist nur darauf zu achten, daß die Eintrocknung grobkörnig und schollig geschieht, da nur so eine einigermaßen genügende Löslichkeit des Serums erhalten bleibt, während bei pulverisierten Trockenseris eine vollständige Lösung später kaum noch in 24—48 Stunden, auch bei Anwendung höherer Temperaturen (37°) zu erreichen ist.

Das bei der Komplementbindungsmethode notwendige spezifische Antigen ist von verschiedenen Autoren in verschiedener Form angewendet worden. Von Kolle und v. Wassermann ist die Bordet-Gengousche Komplementbindungsmethode zur Wertbemessung des Meningokokkenserums in der v. Wassermann-Bruckschen Modifikation benutzt, wobei als Antigen statt der Vollbakterien Schüttelextrakte aus Meningokokkenagarkulturen Verwendung fanden. Kolle und seine Mitarbeiter Krumbein und Schatiloff, sowie Krumbein und Diehl haben später jedesmal frisch hergestellte Meningokokkenaufschwemmungen empfohlen.

Für prüfungstechnische Zwecke kann a priori die Verwendung des Antigens nur in einer Form in Betracht kommen, die seine unveränderliche Konstanz im Gehalt an spezifischen Substanzen bei der Konservierung verbürgt. Die benutzten jedesmal frisch hergestellten Meningokokkenemulsionen würden daher schon aus diesem Grunde nicht angängig sein, weil sie eben infolge der jedesmaligen Neuherstellung keinen stets konstanten, die Feststellung von Vergleichswerten ermöglichenden Maßstab darstellen. Solche Bakterienaufschwemmungen aber lange Zeit unverändert zu konservieren, ist wegen der ständigen autolytischen Vorgänge nicht möglich. Es bleiben also die Meningokokkenschüttelextrakte. v. Wassermann und Leuchs sprechen direkt von einem Standardextrakt, den sie sich aus Meningokokkenkulturen herstellten, indem Kollesche Agarschalen, die zur Erzielung eines polyvalenten (multipartialen) Extrakts mit verschiedenen Meningokokkenstämmen besät waren, mit je 5 ccm sterilem destilliertem Wasser abgeschwemmt wurden. Diese Emulsion wurde im Schüttelapparat geschüttelt, bis 0,5 Proz. mit Karbol versetzt und zentrifugiert, der Abguß wurde in dunklen Flaschen als Standardextrakt auf Eis konserviert. Bezüglich der Haltbarkeit derartig hergestellter Extrakte stellte sich heraus, daß die frisch bereiteten Extrakte während der ersten Wochen in ihrer Wirksamkeit stark zurückgehen, sich dann aber für lange Zeit quantitativ konstant einstellen. Die Autoren benutzten deshalb später nur Extrakte, die längere Zeit, d. h. mehrere Monate abgelagert waren. Nach Verbrauch des jeweiligen Extraktvorrats ist angeblich die genaue Einstellung eines 2. Extrakts zu derselben Stärke mit Hilfe eines Standardserums sehr leicht möglich. Mit diesen Darlegungen war der Weg zur Gewinnung eines Meningokokken-Standardextrakts gegeben und es blieb nur zu untersuchen, ob die angegebene Art der Bereitung und Konservierung die zweckmäßigste und sicherste war, oder ob durch etwaige Modifikationen die Standardisierung des Extraktes noch sicherer und konstanter ermöglicht werden könnte.

Nach einigen Vorversuchen bedienten wir uns zur Herstellung folgenden Verfahrens: Kollesche Agarflaschen werden in gleicher Zahl mit je einem Meningokokkenstamm (verschiedene Laboratoriums- und frisch aus dem Körper gezüchtete Stämme möglischst gemischt) beimpft und nach 36—40-stündigem Verweilen im Thermostaten bei 37° mit je 10—15 ccm 37° warmen sterilen, destillierten Wassers, entsprechend der Stärke des Bakterienrasens, abgeschwemmt. Diese Aufschwemmung wird 30 Stunden im Schüttelapparat bei Zimmertemperatur geschüttelt, danach bis zu völliger Klarheit zentrifugiert und nach probeweiser Einstellung unter einer Toluolschicht in dunkler Flasche mit Paraffin-Gummiverschluß mindestens 3 Monate im Eisschrank aufbewahrt, bis der Extrakt als „abgelagert“ gelten kann. Danach wird derselbe genau eingestellt und je nach dem Grade seiner Selbsthemmung in kleinen Quantitäten in dicht über der Flüssigkeitskuppe abgeschmolzenen Glasröhrchen auf Eis oder besser noch eingefroren konserviert, da bei der von v. Wassermann und Leuchs angegebenen Konservierung des karbolisierten Extraktes im Eisschrank eine völlige Konstanz auf die Dauer uns nicht gewährleistet schien. Auf unsere Art konservierte Extrakte zeigten sich uns bisher noch 14 Monate später in ihrem Gehalt unverändert. Neuerdings beabsichtigen wir aber auch für die Konservierung des Meningokokkenextraktes die Ehrlichsche Vakuummethode anzuwenden, wie sie sich z. B. auch für die Konservierung des labilen Tetanustoxins so unvergleichlich bewährt hat. Da hierbei aber die größte Einzeldosis 0,6 ccm nicht übersteigen darf, wenn nicht die vollständige Evakuierung in Frage gestellt werden soll, so gilt es aus praktischen Gründen, wegen der nicht unerheblichen Kosten jedes Einzelapparates, noch einen derart konzentrierten Extrakt herzustellen, daß die ersten nicht mehr selbsthemmenden, bei der Reaktion zur Verwendung gelangenden Extraktdosen so niedrig (z. B. 0,02—0,01 ccm) liegen, daß der Inhalt eines Röhrchens für den Standard-

und den Prüfungsversuch ausreicht. Es sind deshalb Versuche im Gange, ob es vielleicht gelingt, durch Benutzung des klar zentrifugierten Abgusses der ersten Meningokokkenabschwemmung zu einer 2. und evtl. 3. Abschwemmung jedesmal neu besäter Kollescher Schalen eine derartige Anreicherung der antigenen Substanzen zu erreichen, den Extrakt also gewissermaßen zu sättigen, daß seine spezifische Wirksamkeit noch in den oben genannten hohen Verdünnungen bei der Komplementbindungsreaktion zutage tritt. Sollten jedoch diese Versuche auch zu keinem Resultat führen, so erscheint bereits durch die vorher auseinandergesetzte Konservierung des Testantigens — eingefroren oder auf Eis in kleinen zugeschmolzenen Glasröhrchen — eine auch für prüfungstechnische Zwecke hinreichende Konstanz gewährleistet. Nach Erschöpfung des Vorrates dürfte die Neueinstellung eines Extraktes mit Hilfe des Standardserums auf besondere Schwierigkeiten nicht stoßen.

Wie die vorstehenden Ausführungen zeigen, dürfte also die zu erreichende Qualität eines Standardserums und eines Testantigens für eine Verwendung der Komplementbindungsmethode zur Wertbemessung des Meningokokkenserums auch unter prüfungstechnischen Gesichtspunkten ein Hindernis nicht bieten.

Wenn somit die Verwendbarkeit der Komplementbindungsreaktion für die staatliche Prüfungskontrolle gegeben erscheint, so war doch noch die weitere Frage zu beantworten, ob diese Methode allein zu einer sicheren Bewertung des Meningokokkenserums in seinem Immunkörpergehalt genügt, oder ob ihr nur mehr der Wert einer Ergänzungsmethode bei der amtlichen Wertbemessung des Meningokokkenserums zuzuerkennen sein wird. Für den ersten Fall wäre es unbedingtes Erfordernis, daß die mit der Komplementbindungsmethode bestimmten spezifischen Antikörper in direktem unabänderlichem Zusammenhang mit der Schutz- und Heilwirkung des Meningokokkenserums stehen. Das ist, wie bereits oben erwähnt, nicht der Fall. Sie sind ebensowenig wie die Agglutinine als Heilstoffe anzusehen, da die anfängliche Meinung, die Bordetschen komplementbindenden Antikörper wären mit den bakteriziden Ambozeptoren identisch, jetzt allgemein als irrig angesehen wird (s. a. o. Seite 24—25). Wenn demnach diese Methode der ersten Forderung auch nicht genügt, so besitzt sie andererseits als ergänzendes Wertbestimmungsverfahren doch so viel Bedeutung, daß ihre Verwendung auch in der staatlichen Prüfungskontrolle angängig erscheint, zumal da das Verfahren für Meningokokken als äußerst spezifisch anerkannt ist — entgegen den Befunden Colombos, der die Bordetschen Antikörper noch mit Ambozeptoren identifiziert — und nach den Angaben Onakas der Komplementbindungstiter mit dem Immunisierungsgrade der Serumtiere fortschreitet. Damit besteht

Tabelle 3.
Ansteigen des Komplementbindungstiters während des Immunisierungsaktes.
(betr. der Versuchsanordnung vergl. die Anmerkungen unter Tabelle 1.)

Lfde. Nr.	Im.Se. + Men.Extr. 1/10 + Kompl. 1/10	1. Injektion	2. Injektion	3. Injektion	4. Injektion [1]	5. Injektion	6. Injektion	7. Injektion	9. Injektion [2]	10. Injektion	12 Tage	16 Tage	20 Tage
											nach der 10. Injektion		
1	0,25 + 0,5 + 0,5	H. deutl.	H. kplt.	H. kplt.	H. fst. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kplt.	H. kptl.	H. kplt.
2	0,2 + „ + „	„	fst. kplt.	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„
3	0,1 + „ + „	Spur	„	„	deutl.	„	„	„	„	„	„	„	„
4	0,05 + „ + „	0	deutl.	deutl.	Spur	deutl.	„	„	„	„	„	„	„
5	0,01 + „ + „	0	0	0	0	0	Spur	Spur	„	„	Spur	0	0
6	0,005 + „ + „	0	0	0	0	0	0	0	H. fst. kplt.	„	Spürchen	0	0
7	0,002 + „ + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0,001 + „ + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0,002 — + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0,005 — + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0,05 — + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0,2 — + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0,25 — + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	— 0,5 + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	— „ + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	N.Se. 0,25 + „ + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0,25 — + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0,5 — + „	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) Serumprobe völlig dick, ist vom fiebernden Pferd entnommen. Vergl. auch Resultat des Tropinversuchs Nr. 4 in Tabelle 5 (Seite 42).

2) Serumprobe 8 nicht geliefert.

aber die Wahrscheinlichkeit, daß von den zahlreichen noch unbekannten therapeutisch wirksamen Stoffen im Meningokokkenserum doch die einen oder anderen durch die Titrierung der komplementbindenden Antikörper mitbestimmt werden. Nach unseren Untersuchungen über den graduellen Anstieg dieser Antikörper während des Immunisierungsaktes beim Pferd konnten wir die Angaben ONAKAS vollauf bestätigen. Die einzelnen bei den verschiedenen Blutungen des Serumtieres entnommenen Serumproben wurden uns in liebenswürdiger Weise von Herrn Prof. RUPPEL, Leiter der bakteriologischen und Serumabteilung an den Höchster Farbwerken, zur Verfügung gestellt. Wie die in der Tabelle 3 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, ist die allmähliche Zunahme an komplementbindenden Antikörpern überall deutlich (betreffs der Ausnahme in Serumprobe 4 vergl. die Anmerkung bei Tabelle 3) Das Maximum ist in der Serumprobe nach der zehnten Injektion erreicht. Danach macht sich bald eine deutliche, aber anscheinend längere Zeit konstant bleibende Abnahme an BORDETschen Antikörpern bemerkbar.

Was die Ausführung der Reaktion anbetrifft, so ist alles nähere aus den angeführten Protokollen ersichtlich. Eine jedesmalige Komplement- und Ambozeptortitrierung und, solange man nicht über ein standardisiertes Testantigen verfügt, auch dessen Austitrierung, hat dem eigentlichen Komplementbindungsversuch vorauszugehen. Die Verwendung starker Ambozeptordosen (das dreifache der nach 20 Minuten lösenden kleinsten Ambozeptormenge) und spärliche Extraktdosen ($^1/_3$ der letzthemmenden bezw. $^1/_2$ der ersten Lösung nicht mehr hindernde Dosis) empfiehlt sich zur Vermeidung von Fehlerquellen sehr. Die obligatorische Einführung eines bestimmten Titers wird sich wohl für die staatliche Prüfungskontrolle als erforderlich erweisen. Am Institut für Infektionskrankheiten war komplette Hemmung bis zur Dosis von 0,005 (1:200 der Immunserumverdünnungen) für ein brauchbares Serum Vorschrift.

Kurz resümierend können wir nach unseren Darlegungen über die Eignung der Komplementbindungsreaktion zur Verwendung bei der amtlichen Wertbemessung des Meningokokkenserums wohl sagen, daß das Verfahren zwar nicht allen Anforderungen, die an eine allein gültige Prüfungsmethode zu stellen sind, entspricht und daher nicht als einziges Wertbestimmungsverfahren in Frage kommen kann; andererseits besitzt die Komplementbindungsmethode auch in praktischer Hinsicht so viel Vorzüge, daß sie als ergänzendes Verfahren stets brauchbare Ergebnisse verspricht, so daß sie in der staatlichen Prüfungskontrolle so lange mit Vorteil Verwendung finden kann, bis eine brauchbare Methode des quantitativen Antitoxinnachweises im Tierversuch (s. a. o. Seite 20—23) ausgearbeitet ist.

Als letztes Verfahren zur Wertbemessung des Meningokokkenserums in vitro kommt die Bestimmung der bakteriotropen Substanzen in Frage.

Schon JOCHMANN hat den Nachweis geliefert, daß im Meningokokkenserum neben antitoxischen Stoffen und bakteriziden Ambozeptoren auch phagozytosebefördernde Substanzen enthalten sind. Zur Wertbemessung des Serums hat er dieselben jedoch nicht herangezogen. NEUFELD hat dann unter Anlehnung an eine von DENYS und LECLEFF für das Streptokokkenserum angegebene und von MENNES auch beim Pneumokokkenserum mit Erfolg angewandte Methode ein Verfahren zur Austitrierung der bakteriotropen Stoffe des Meningokokkenserums im Reagenzglas ausgearbeitet. Seine Methode gestaltet sich so, daß abgestufte Immunserummengen in vitro mit Meningokokken und Leukozyten gemischt eine gewisse Zeit bei 37° gehalten werden, und in dem alsdann angefertigten, gefärbten Ausstrichpräparat unter dem Mikroskop die unterste Serumverdünnung festgestellt wird, bei welcher gegenüber Kontrollen ohne Immunserumzusatz eine spezifische Anregung der Phagozytose deutlich erkennbar ist. JOCHMANN hat auf diese NEUFELDsche Methode als sehr beachtenswert hingewiesen. FLEXNER und JOBLING benutzen die Wertbestimmung des Meningokokkenserums nach dem Tropingehalt ausschließlich und angeblich mit sicherem Erfolg. Auch KRAUS und BÄCHER, desgleichen BÄCHER und HACHLA haben bei ihren Nachprüfungen die Methode brauchbar gefunden und sie als Prüfungsverfahren für das Meningokokkenserum — evtl. neben dem Nachweis der giftneutralisierenden Substanzen des Serums — empfohlen. Endlich haben auch v. WASSERMANN sowie ONAKA den Wert der Tropinmethode als Hilfsverfahren zur Wertbemessung des Meningokokkenserums anerkannt. Ueber die praktische Brauchbarkeit der NEUFELDschen Reagenzglasmethode herrscht also unter den beteiligten Fachmännern zurzeit kein Zweifel mehr. Dazu kommt, daß den bakteriotropen Eigenschaften des Meningokokkenserums jetzt allgemein auch ein beträchtlicher, nach JOCHMANN sogar der bedeutendste Anteil an der Heilwirkung des Serums beigemessen wird. Es können also — im Gegensatz zu den komplementbindenden Stoffen, wo nach unseren obigen Ausführungen dies noch unsicher ist — durch die Titrierung der Bakteriotropine tatsächlich kurativ wertvolle Bestandteile des Meningokokkenserums bestimmt werden. Demnach handelte es sich für uns nur darum, zu untersuchen, ob die Methode in der von NEUFELD angegebenen Ausführungsform[1]) ohne weiteres auch für die Zwecke der staatlichen Serumprüfung verwertbar war. Der Autor, der sein Verfahren neben

1) Med. Klin., 1908, Nr. 30; Arb. a. d. Kais. Gesundh.-Amt, 1910 Bd. 34, Nr. 3.

der Komplementbindungs-Reaktion zur staatlichen Prüfung des Meningokokkenserums empfohlen hat, läßt nämlich bei Besprechung seiner Methodik selbst mehrfach die Frage offen, ob durch etwaige Abänderungen in der Technik bezw. Eruierung und Ausschaltung einiger bisweilen störender Faktoren die Resultate des bakteriotropen Reagenzglasversuchs sich nicht noch gleichmäßiger gestalten lassen, was ja gerade für die prüfungstechnische Praxis von ausschlaggebender Bedeutung wäre. Dazu war von anderer Seite auf die durch öfters beobachtete schlechte Färbbarkeit einzelner Meningokokken bedingte Unsicherheit in der Beurteilung der Resultate, ferner auf die bei manchen Meningokokkenstämmen erwiesene entweder schon primär bestehende oder bei künstlicher Fortzüchtung eingetretene Neigung zur Spontanphagozytose durch normale Sera hingewiesen. Andererseits sollen Stämme vorkommen, die so gut wie garnicht phagozytiert werden. Endlich berichtete Onaka, das bei Benutzung verschiedener echter Meningokokkenstämme zur Austitrierung desselben Meningokokkenserums mittels der Tropinmethode sich quantitativ schwankende Resultate ergaben (vergl. dazu die 4 Versuchsprotokolle S. 38).

Unsere Untersuchungen, zu deren Illustrierung nachstehend mehrere Protokolle wiedergegeben sind (Seite 34—38) zeigten uns jedenfalls, daß die der bakteriotropen Reagenzglasmethode anhaftenden Mängel nur geringfügiger Natur sind, und daß es zweifellos gelingt, auch in prüfungstechnischem Sinne hinreichend genaue und sichere Vergleichswerte damit zu erzielen.

20. 5. 1912.

Tropinversuch mit Dresdener Meningokokken Standard-Serum.
a) flüssig, b) trocken (gelöst 1:10)
Versuchsanordnung: I.Se. + Kokken + Leukozyten $1^1/_2$ Std. bei 37°.
Gegen Stamm E. 24-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a	Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b
1	0,01	+++	1	0,01	+++
2	0,005	++ bis +++	2	0,005	+++
3	0,002	++	3	0,002	++
4	0,001	++	4	0,001	++
5	0,0005	+ bis ++	5	0,0005	+ bis ++
6	0.0002	schwach +	6	0,0002	schwach +
7	0,0001	fast 0	7	0,0001	0
8	N.Se. 0,01	0	8	N.Se. 0,01	0
9	NaCl 0,2	0	9	NaCl 0,2	0

Konturen der Kokken vielfach sehr unscharf.

24. 5. 1912.

Tropinversuch mit Dresdener Meningokokken-Serum (flüssig).
Versuchsanordnung wie oben.
Gegen Stamm E. a) 26-stündig, b) 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a		Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b	
1	0,01	++		1	0,01	+++	
2	0,005	++		2	0,005	+++	
3	0,002	++ bis +++		3	0,002	++ bis +++	
4	0,001	++ bis +++		4	0,001	++ bis +++	
5	0,0005	++	häufige degenerierte Formen	5	0,0005	+ bis ++	Gut erhaltene Formen der Kokken
6	0,0002	+		6	0,0002	+	
7	0,0001	±		7	0,0001	±	
8	N.Se. 0,01	±		8	N.Se. 0,01	fast 0	
9	NaCl 0,2	±		9	NaCl 0,2	0	

In den Kontrollen geringe Spontanphagozytose. | Kontrollen frei von Spontanphagozytose.

24. 5. 1912.

Tropinversuch mit Dresdener Meningokokken-Serum (flüssig).
Versuchsanordnung: I.Se. + Kokken $^1/_2$ Std. bei 37°, dann Leukozyten dazu und 1 Std. bei 37°.
Gegen Stamm E. a) 24-stündig, b) 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a	Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b	
1	0,01	+++	1	0,01	+++	
2	0,005	+++	2	0,005	+++	
3	0,002	++ bis +++	3	0,002	++ bis +++	
4	0,001	++	4	0,001	++ bis +++	
5	0,0005	+ bis ++	5	0,0005	++	Weniger degenerierte Formen wie bei 24-stünd. Kultur. Keine Spontanphagozytose
6	0,0002	+ bis ++	6	0,0002	++	
7	0,0001	+	7	0,0001	+	
8	N.Se. 0.01	±	8	N.Se. 0,01	±	
9	NaCl 0,2	±	9	NaCl 0,2	0	

24. 5. 1912.

Tropinversuch mit Dresdener Meningokokken-Serum (flüssig).
Versuchsanordnung: Die Mischung von Se. + Kokken + Leukozyten gepfropft und 20 Min. geschüttelt, dann $1^1/_4$ Std. bei 37°.
Gegen Stamm E. a) 24-stündig, b) 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a		Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b
1	0,01	+++		1	0,01	+++
2	0,005	+++		2	0,005	+++
3	0,002	++ bis +++		3	0,002	±
4	0,001	++		4	0,001	++
5	0,0005	+ bis ++	Viel Detritus	5	0,0005	±
6	0,0002	+		6	0,0002	+
7	0,0001	+ (schwach)		7	0,0001	±
8	N.Se. 0,01	+ (schwach)		8	N.Se. 0,01	±
9	NaCl 0,2	±		9	NaCl 0,2	±

Spontanphagozytose und nicht quantitative Resultate.

30. 5. 1912.

Tropinversuch mit Dresdener Meningokokken-Serum (flüssig).

Zuerst Kokken mit Se. sensibilisiert $^1/_2$ Std. bei 37°, dann Leukozytenzusatz und 15 Min. Schüttelapparat, sodann $^3/_4$ Std. bei 37°. Die Leukozyten sind in der elektrischen Zentrifuge ausgeschleudert.

Gegen Stamm E. a) 24-stündig, b) 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a		Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b	
1	0,02	+++		1	0,02	+++	
2	0,01	+++		2	0,01	+++	
3	0,005	+++		3	0,005	+++	
4	0,002	++ bis +++		4	0,002	++	
5	0,001	++		5	0,001	++	
6	0,0005	+		6	0,0005	+ bis ++	
7	0,0002	±		7	0,0002	+	Formen der Kokken sehr gut erhalten
8	0,0001	±		8	0,0001	±	
9	N.Se. 0,02	±	Spontanphagozytose	9	N.Se. 0,02	0	
10	0,2 phys. NaCl-Lösung	±		10	NaCl-Kontrolle	0	

30. 5. 1912.

Tropinversuch wie vor; jedoch Leukozyten mit Wasserzentrifuge ausgeschleudert.

Gegen Stamm G. a) 24-stündig, b) 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a		Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b	
1	0,02	+++		1	0,02	+++	
2	0,01	+++		2	0,01	+++	
3	0,005	+++		3	0,005	+++	
4	0,002	++ bis +++		4	0,002	++ bis +++	
5	0,001	++	Zahlreiche	5	0,001	++	
6	0,0005	+ bis ++	Kokken in	6	0,0005	++	Formen der
7	0,0002	+	Zerfall	7	0,0002	+	Kokken sehr
8	0,0001	±		8	0,0001	±	gut erhalten
9	N.Se. 0,02	±		9	N.Se. 0,02	0	
10	NaCl-Kontrolle	±		10	NaCl-Kontrolle	0	

31. 5. 1912.

Tropinversuch mit Meningokokken-Standard-Serum (trocken)

Verwendung von 37° warmer 0,85-proz. NaCl-Lösung zum Abschwemmen der Leukozyten im Meerschweinchen, zum Waschen derselben und zum Aufschwemmen nach dem Zentrifugieren.

Se. + Kokken $^1/_2$ Std. bei 37°, danach Leukozytenzusatz und 1 Std. bei 37°.

Gegen Stamm E. 24-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat : 2 Tropfen Kokkenemulsion		Nr.	I.Se. Verd.	Resultat : 1 Tropfen Kokkenemulsion
1	0,01	+++		1	0,01	+++
2	0,005	+++		2	0,005	+++
3	0,002	++ bis +++		3	0,002	++
4	0,001	++	Es sind zu	4	0,001	+ bis ++
5	0,0005	+	viel Kokken	5	0,0005	+
6	0,0002	+	außerhalb,	6	0,0002	+
7	0,0001	±	die das Bild	7	0,0001	±
8	N.Se. 0,02	±	stören.	8	N.Se. 0,02	0 ?
9	NaCl 0,2	±		9	NaCl 0,2	0 ?

18. 10. 1912.

Tropinversuch mit Meningokokken-Trocken-Standard-Serum

$^3/_4$ Std. sensibilisiert, $^3/_4$ Std. mit Leukozyten bei 37° (3 mal schütteln in der ersten Viertelstunde).

Gegen Stamm E. 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei: NaCl-Lösung 37° warm, ohne Natr. citr.-Zusatz	Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei: Verwendung von 37° warmer NaCl-Lösung mit $^1/_{10}$ Proz. Natr. citr.[1])
1	0,02	Versuch wegen völliger	1	0,02	+++
2	0,01	Gerinnung der Leuko-	2	0,01	+++
3	0,005	zytenabschwemmung	3	0,005	++ bis +++
4	0,002	unmöglich.	4	0,002	++ bis +++
5	0,001		5	0,001	++
6	0,0005		6	0,0005	+ bis ++
7	0,0002		7	0,0002	±
8	0,0001		8	0,0001	∓
9	N.Se. 0,02		9	N.Se. 0,02	∓
10	NaCl 0,2		10	NaCl 0,2	0

18. 9. 1912.

Tropinversuch mit Meningokokken-Standard-Trockenserum

a) Kokken $^3/_4$ Std. mit Se. sensibilisiert, darauf $^3/_4$ Std. bei 37°

b) „ $^3/_4$ „ „ „ „ „ $^1/_2$ „ „ 37°

Verwendung von 37° warmer NaCl-Lösung

Gegen Stamm E. 24-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a	Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b
1	Kontrolle	±	1	0,01	+++
2	0,01	+++	2	0,005	++ bis +++
3	0,005	++ bis +++	3	0,002	+ bis ++
4	0,002	++	4	0,001	+
5	0,001	++	5	0,0005	+
6	0,0005	schwach +	6	0,0002	schwach +
7	0,0002	„ +	7	0,0001	±
8	0,0001	±	8	Kontrolle: vereinzelt Spontanphagozytose	
Kontrolle nicht einwandfrei.			Phagozytose deutlich schwächer. Kontrolle nicht einwandfrei.		

18. 9. 1912.

Tropinversuch wie vorher.

Gegen Stamm E; jedoch 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a		Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b	
1	Kontrolle	0, sehr deutlich		1	0,01	++	
2	0,01	+++		2	0,005	+ bis ++	
3	0,005	meist +++		3	0,002	schwach +	Formen der
4	0,002	++	Formen der	4	0,001	±	Kokken
5	0,001	+ bis ++	Kokken	5	0,0005	±	sehr gut
6	0,0005	+	sehr gut	6	0,0002	fast 0	erhalten.
7	0,0002	±	erhalten.	7	0,0001	0	
8	0,0001	0		8	Kontrolle	0, sehr deutlich	

Das Protokoll betont ausdrücklich das Fehlen jeder Spontanphagozytose in den Kontrollen.

1) Bei Zusatz von $^1/_2$ Proz. Natr. citr. ist die Phagozytose völlig gehemmt, bei $^1/_4$ Proz. Natr. citr. merkliche Verminderung der Phagozytose, bei $^1/_8$—$^1/_{10}$ Proz. Natr. citr. ist ein schädigender Einfluß nicht bemerkbar und Gerinnung trotz des geringen Zusatzes von Natr. citr. nie bemerkt.

14. 11. 12. bezw. 18. 1. 13.

Tropinversuch mit Meningokokken-Trocken-Standard-Serum.

a) $^3/_4$ Std. sensibilisiert, $^3/_4$ Std. mit Leukozyten bei 37°; während der ersten Viertelstunde 3mal geschüttelt.

b) $^1/_2$ Std. sensibilisiert, 1 Std. mit Leukozyten bei 37°.

Zur Ausspülung 37° warme NaCl-Lösung mit $^1/_{10}$ Proz. Natr. citr.

Gegen Stamm E. 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a 14. 11. 12	a) 18. 1. 13	Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei b
1	0,02	+++	+++	1a	0,02	+++
2	0,01	+++	+++	2	0,01	+++
3	0,005	+++	++ bis +++	3	0,005	++ bis +++
4	0,002	++ bis +++	++ bis +++	4	0,002	++
5	0,001	++	++	5	0,001	+ bis ++
6	0,0005	+ bis ++	+ bis ++	6	0,0005	+
7	0,0002	schwach +	schwach +	7	0,0002	±
8	0,0001	fast 0	±	8	0,0001	fast 0
9	N.Se. 0,02	0	0	9	N.Se. 0,02	0
10	NaCl 0,2	0	0	10	NaCl 0,2	0
				Phagozytose schwächer wie bei a.		

Verwendung verschiedener Meningokokkenstämme gegenüber demselben Meningokokkenserum.

Tropinversuche mit Meningokokken-Serum Merck v. 29. 5. 1911 gegen Stamm I. E., II. Br., III. G., IV. H.

Am 16. 8. 1911. Kultur 12-stündig.

Nr.	I.Se. Verd.	Resultat			
		I	II	III	IV
1	0,02	+++	+++	+++	+++
2	0,01	+++	+++	+++	+++
3	0,005	++ bis +++	++	++ bis +++	+++
4	0,002	++	++	++	++
5	0,001	++	+ bis ++	++	++
6	0,0005	+ bis ++	+ bis ++	++	++
7	0,0002	±	±	±	++
8	0,0001	±	±	∓	+
9	N.Se. 0,02	0	0	0	+
10	NaCl 0,2	0	0	0	+

Die drei Stämme E., Br. und G. zeigen alle fast ganz gleiche Titer mit demselben Serum. Stamm H. ist infolge Neigung zu starker Spontanphagozytose ungeeignet für die Tropinmethode.

Wegen der Einzelheiten, soweit sie nicht aus den angeführten Protokollen ersichtlich sind, sei auf die Abhandlung BOEHNCKE: „Zur Methodik des bakteriotropen Reagenzglasversuchs“ aus dem 67. Bande, Heft 7, des Centralblatts für Bakteriologie, I. Abteilung, Originale, verwiesen und nur die Zusammenfassung der als zweckmäßig er-

achteten Modifikationen der NEUFELDschen Versuchstechnik hier wiederholt:

„300—350 g schwere Meerschweinchen werden 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 5—10 ccm mit etwas (0,5) Aleuronat versetzter Nährbouillon durch vorsichtigen Nackenschlag oder Betäubung getötet. Das zähe Peritonealexsudat wird mit etwa 50 ccm $^1/_{10}$ Proz. Natrium citricum enthaltender 37° warmer physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, die Waschflüssigkeit (nach Entfernung etwaiger gröberer Aleuronatpartikel und Fibrinflocken) vorsichtig mit geringer Tourenzahl zentrifugiert und der Bodensatz nach jedesmaligem Durchwirbeln zweimal mit 37° warmer physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Von den restierenden Leukozyten wird in 37° warmer NaCl-Lösung eine Aufschwemmung hergestellt, die in ihrer Konsistenz einer $^1/_3$-prozentigen Lezithinemulsion entspricht (MEYER).

Zur Bakterienaufschwemmung werden gut bewachsene 12—14-stündige Schrägagarkulturen mit je 0,5 ccm NaCl-Lösung + 0,5 ccm Bouillon abgeschwemmt und sorgfältig — unter Vermeidung sichtbarer Klümpchen — emulsioniert. Die Bakterienaufschwemmung ist so dicht zu wählen, daß sie in ihrem Aussehen einer Bouillon mit einem Gehalt von 0,2 g Aleuronat pro 3 ccm — aufgeschüttelt — entspricht. Von Verdünnungen des Immunserums

1 : 10 werden je 0,2; 0,1; 0,05
1 : 100 „ „ 0,2; 0,1; 0,05
1 : 1000 „ „ 0,2; 0,1; 0,05

in kleine (5 cm hohe, 6 mm weite) Reagenzröhrchen in besonderen niedrigen Doppelgestellen gefüllt und dazu je ein Tropfen der Bakterienaufschwemmung aus ein und derselben Tropfpipette für alle gleichzeitig angesetzten Tropinversuche hinzugetan. Außerdem für jeden Versuch ein Kontrollröhrchen mit 0,2 NaCl-Lösung und 0,2 $^1/_{10}$ Normalserum derselben Art wie das Immunserum plus 1 Tropfen Bakterienemulsion. Nach $^3/_4$-stündigem Sensibilisieren der Bakterien bei 37° werden pro Röhrchen zwei Tropfen der Leukozytenaufschwemmung hinzugegeben, diese kräftig durchgeschüttelt und für weitere $^3/_4$ Stunden im Brutschrank konserviert. Während der ersten Viertelstunde wird das Reagenzglasgestell zweckmäßig noch 2—3mal durchgeschüttelt. Danach Abguß der überstehenden Flüssigkeit, Einstellen der Gläschen umgekehrt in ein neues Gestell mit dicker Fließpapierunterlage und Anfertigung von je zwei Ausstrichpräparaten vom Bodensatz jedes Röhrchens. Nach Aether-Alkoholfixierung Färbung mit (Manson-) Methylenblau und schätzungsweise Feststellung der graduellen Abstufungen der Phagozytose.

Unser Versuchsprotokoll lautet so:

Datum .....

Tropinversuch
a) mit Meningokokkenserum Nr. x,
aus der Fabrik x
gegen 12-stündige Meningokokkenagarkultur x
b) mit Meningokokkenstandardserum wie vor.

Lfde. Nr.	I.Se. Verd.	Resultat bei a	Standard-serum-verd.	Resultat bei b
1	0,02		0,02	
2	0,01		0,01	
3	0,005		0,005	
4	0,002		0,002	
5	0,001		0,001	
6	0,0005		0,0005	
7	0,0002		0,0002	
8	0,0001		0,0001	
9	0,2 NaCl-L.		0,2 NaCl-L.	
10	0,2 $^1/_{10}$ N.Se.		0,2 $^1/_{10}$ N.Se.	

In dieser Anordnung hat uns der bakteriotrope Reagenzglasversuch in zahlreichen Fällen sehr gute, deutlich vergleichbare Resultate bei der Prüfung verschiedener Immunsera, besonders Meningokokkensera geliefert."

In das Protokollmuster ist bereits ein Standardserum mitaufgenommen. Auch NEUFELD, sowie KRAUS und BÄCHER empfehlen die Anwendung eines solchen, um die Werte der anderen Sera und auch die Phagozytierbarkeit der Kulturen messen zu können. Für die staatliche Prüfungskontrolle ist die Einführung eines Standardserums als vergleichenden Maßstabes (oben schon näher erläutert) ein unbedingtes Erfordernis. Wie die vorausstehenden Protokolle dartun, ist für den Tropinversuch das evakuierte flüssige, wie Trockenserum in gleicher Weise verwertbar. Wie NEUFEDS Untersuchungen zeigten, die wir — wenigstens für den Zeitraum eines Jahres — bestätigen konnten, sind die Bakteriotropine auch in mit Karbol versetzen, flüssigen, einfach im Eisschrank fest verkorkten Meningokokkenseris sehr haltbar. Unzweckmäßige Aufbewahrung bei starker Wärme (37°) schädigten sie dagegen erheblich (vergl. nachstehendes Protokoll).

Tropinversuch mit Meningokokkenserum Bern Nr. 34 und 35 mit Stamm E. 12-stündig.

Lfde. Nr.	I.Se. Verd.	Nr. 34			Nr. 35		
		Resultat 15.8.11	Eisschrank 4. 10. 12	Brutschrank 4. 10. 12	Resultat 15. 8. 11	Eisschrank 4. 10. 12	Brutschrank 4. 10. 12
1	0,02	+++	+++	+−++	+++	+++	+ bis ++
2	0,01	+++	++ bis +++	+−++	+++	+++	+ bis ++
3	0,005	+++	++ bis +++	+	+++	++	+
4	0,002	++	++	±	++	++	+
5	0,001	++	+	±	+bis++	+	±
6	0,0005	+	+	±	+	±	fast 0
7	0,0002	±	±	0	±	±	fast 0
8	0,0001	0	0	0	0	0	0
9	N.Se. 0,02	0	0	0	0	0	0
10	NaCl. 0,2	0	0	0	0	0	0

Darin verhalten sie sich also ähnlich wie die komplementbindenden Stoffe, aber anders als die Agglutinine, bei denen sich in einigen gleichzeitig agglutinierenden Seris ein starker Rückgang nach einjähriger Konservierung im Eisschrank gegenüber dem — von der Fabrik angegebenen — Anfangstiter bemerkbar machte (s. nachstehendes Protokoll in Tabelle 4).

Tabelle 4.

Kontr.-Nr. des Serums	Ursprünglicher Titer	Konservierung im:	1:25	1:50	1:75	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500	1:600
34 Bern	1:2000	Eisschr.	+++	+++	+++	++	++	+	schw.+	±	∓
		Brutschr.	++	++	+	±					
35 Bern	1:2000	Eisschr.	++	+	±	0					
		Brutschr.	schw.+	0	0	0					
36 Bern	1:2000	Eisschr.	+++	+++	++	±					
		Brutschr.	±	0	0	0					

Die Frage des Standardserums dürfte also unter keinen Umständen bei der Anwendung der Tropinmethode in vitro einen Hinderungsgrund in irgend einer Beziehung abgeben.

Wir haben dann noch den Anstieg des bakteriotropen Titers in einem Meningokokkenserum während der einzelnen Phasen der Immunisierung geprüft. Die untersuchten Serumproben (Tabelle 5) sind dieselben wie die zur Feststellung des komplementbindenden Titers in Tabelle 3 benutzten. Der Paralellismus der einzelnen Reihen in beiden Tabellen dürfte ohne weiteres ersichtlich sein.

Ob ein solcher Paralellismus immer zu beobachten sein wird, muß vorläufig noch dahingestellt bleiben. Die Untersuchungen von ONAKA, sowie unsere eigenen konnten zwar den allmählichen Anstieg des komplementbindenden Titers eines Serums während der einzelnen Phasen des Immunisierungsaktes veranschaulichen, wie es in gleicher Weise sich zeigt in Tabelle 5 für den Anstieg der Bakteriotropine. Ferner ließen in der Regel die von uns untersuchten Meningokokkensera, welche eine spezifische Phagozytose noch in sehr hohen Verdünnungen verursachten, auch einen hohen komplementbindenden Titer erkennen, beispielsweise das Meningokokkenserum Bern No. 36, das von allen untersuchten Seris sowohl den höchsten komplementbindenden Titer, nämlich in einer Verdünnung von 0,002 und höchsten bakteriotropen Titer (deutliche Phagocytose noch bei 0,0001) aufwies. Ob dieser Paralellismus zwischen komplementbindendem und bakteriotropem Titer beim Meningokokkenserum eine konstante Erscheinung ist, kann bei der immerhin beschränkten Zahl unserer Untersuchungen nicht

Tabelle

Anstieg des bakteriotropen Titers

Lfde. Nr.	I.Se. Verd.	Blutentnahme nach: 1. Injektion	2. Injektion	3. Injektion	4. Injektion [1])	5. Injektion
1	0,02	0	0	+ bis ++	±	++
2	0,01	0	0	+	0	+
3	0,005	0	0	±	0	schwach +
4	0,002	0	0	0	0	∓
5	0,001	0	0	0	0	0
6	0,0005	0	0	0	0	0
7	0,0002	0	0	0	0	0
8	0,0001	0	0	0	0	0
9	I.Se. 0,02	0	0	0	0	0
10	NaCl 0,2	0	0	0	0	0

sicher entschieden werden, zumal auch wir in vereinzelten Fällen Schwankungen in dem Gehalt an beiden Substanzen bemerken konnten. Immerhin sprechen unsere Ergebnisse für die Wahrscheinlichkeit eines ziemlich weitgehenden Paralellismus im Gehalt des Meningokokkenserums an komplementbindenden und bakteriotropen Substanzen, was natürlich von besonderem Wert sein würde für die Verwendungsmöglichkeit beider Prüfungsmethoden nebeneinander zur Wertbemessung dieses Serums.

Von einzelnen Autoren ist die Festlegung eines bakteriotropen Mindesttiters als Maßstab für ein in der Praxis brauchbares Meningokokkenserum als wünschenswert erachtet worden. Selbstverständlich würde auch in der staatlichen Prüfungskontrolle ein derartiges Mindestmaß an bakteriotropen Fähigkeiten für jedes zuzulassende Serum von vorneherein zur Bedingung gemacht werden. Als solch ein Mindesttiter könnte auf Grund unserer sehr zahlreichen Untersuchungen mit den verschiedensten Meningokokkenseris, die Forderung einer deutlichen Anregung der Phagozytose noch in der Immunserumverdünnung von 0,001 angängig und keinesfalls als übermäßig bezeichnet werden. Nur möchten wir vorschlagen, in der Praxis anstatt der Benennung des bakteriotropen Titers nach dem Grade der Immunserumverdünnung lieber die in der Serumprüfung bereits allgemein eingeführte Nomenklatur nach einem Normalserum und so und so vielfach höher wertigen Seris derselben Art zu benutzen. Es wäre also ein Normal- oder einfaches Meningokokkenserum ein solches, das in der Verdünnung von 0,01 eine deutliche spezifische Anregung der Phagozytose gegenüber entsprechenden Kontrollen verursacht. Ein Meningokokkenserum, das dieselben Eigenschaften in der Verdünnung von 1 : 1000 bezw. 1 : 2000 bezw.

1) Serumprobe völlig dick, ist vom fiebernden Pferd entnommen. Vergl. auch die Resultate des Komplementbindungsversuchs Nr. 4 in Tabelle 3.

5.

während des Immunisierungsaktes.

Blutentnahme nach: 6. Injektion	7. Injektion	9. Injektion [2])	10. Injektion	20 Tage nach der 10. Injektion
++	++ bis +++	+++	+++	+++
++	++	++	++ bis +++	++
+--++	++	++	++	++
+	+	+ bis ++	+ bis ++	+ bis ++
±	+	+ bis ++	+ bis ++	+
0	0	+	schwach +	±
0	0	0	±	0
5	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

1 : 5000 usw. zeigt, würde demnach als ein 10-, 20- oder 50faches usw. zu bezeichnen sein. Nach unserem Vorschlage wäre somit ein 10faches Meningokokkenserum das niedrigste, das auf Grund der Beurteilung seiner bakteriotropen Eigenschaften für die Verwendung in der Praxis zugelassen werden könnte. Es würde eine solche, bereits allgemein gebräuchliche und einfache Bezeichung auch sicher von den Klinikern und Aerzten freudiger begrüßt und verständnisvoller aufgefaßt werden, als die zurzeit noch immerhin fernliegende Bezeichnung des eigentlichen bakteriotropen Titers als solchen.

Resümierend läßt sich über die Tropinmethode in vitro sagen, daß sie geeignet erscheint, hinlänglich genaue und gleichmäßige Resultate in der Wertbemessung des Meningokokkenserums zu garantieren und daß die möglichen Schwankungen aus nebensächlicheren Ursachen nicht so bedeutende sind, um ihre Verwendung in der staatlichen Prüfungskontrolle zu verhindern. Da ferner mit dieser Methode sicher Werte bestimmt werden, die bei der Heilwirkung des Meningokokkenserums eine nicht unbeträchtliche Rolle spielen, so dürfte es angebracht sein, auf die Titrierung der bakteriotropen Serumstoffe in vitro zur Wertbemessung des Meningokokkenserums in erster Linie zu rekurrieren und daneben als Hilfsmethode die Komplementbindungsmethode mit zu verwenden.

Schlußsätze.

Auf Grund der vorstehend geschilderten Ansichten und Ergebnisse anderweitiger, sowie auf Grund der Resultate eigener Untersuchungen läßt sich über die Ein- und Ausführung einer staatlichen Prüfung des Meningokokkenserums folgendes sagen:

2) Serumprobe der 8. Blutung nicht erhalten.

1. Die Notwendigkeit der Unterstellung des Meningokokkenserums unter die staatliche Prüfungskontrolle ist ein dringendes Bedürfnis und allgemein anerkannt.

2. Die Auswertung im Tierversuch erscheint zurzeit noch nicht mit der Sicherheit möglich, wie sie für staatliche Prüfungszwecke unbedingtes Erfordernis ist. Vielleicht ist bei weiterem Ausbau der antitoxischen Wertbestimmungsmethode in der im Text angegebenen Richtung späterhin auch eine Verwendung des Tierversuchs möglich.

3. Von den Wertbemessungsmethoden in vitro bietet die von Neufeld vorgeschlagene Bestimmung der bakteriotropen Substanzen vermittels des bakteriotropen Reagenzglasversuchs unter Zugrundelegung eines Standardserums mit den hier angegebenen Modifikationen genügende Sicherheit und Exaktheit, um auch in der staatlichen Prüfungstechnik Verwendung zu finden. Daneben empfiehlt es sich bis auf weiteres jedes Meningokokkenserum, unter Verwendung eines Standardserums und Standardextrakts, auch auf komplementbindende Antikörper in der von v. Wassermann und Bruck angegebenen Methodik zu prüfen.

4. Außer dieser speziellen Wertbemessung empfiehlt sich bei der staatlichen Kontrolle jedes Meningokokkenserums noch eine Prüfung auf Unschädlichkeit in der gleichen Art wie für die übrigen in der Humanmedizin angewendeten Sera üblich, nämlich auf: Keimfreiheit, Karbol- und Eiweißgehalt.

5. Obwohl die Grundlagen für eine staatliche Prüfung hinsichtlich der therapeutischen Wirksamkeit des Meningokokkenserums als gegeben zu erachten sind und somit Bedenken gegen eine sofortige Einführung der definitiven Prüfungskontrolle des Meningokokkenserums nicht bestehen dürften, empfiehlt es sich aus prüfungstechnischen Gründen vorerst die Prüfung noch provisorisch zu gestalten.

Ueber den Parallelismus der Pneumokokkenantikörper in vitro und in vivo und ihre Haltbarkeit im Pneumokokkenserum

Von

K. E. Boehncke und **J. Mouriz-Riesgo**

Bei der gesteigerten Anwendung, die das Pneumokokkenserum in den letzten Jahren bei der Behandlung der Pneumonie und anderer Pneumokokkeninfektionen in praxi gefunden hat, erschien es von Interesse, an mehreren Pneumokokkenseris verschiedener Herkunft Untersuchungen anzustellen über den Parallelismus der in vitro und in vivo in Erscheinung bezw. in Wirkung tretenden Antikörper. Gleichzeitig sollte daneben die Frage der Widerstandsfähigkeit der verschiedenen im Serum vorhandenen Immunstoffe gegenüber schädigenden äußeren Einflüssen geprüft und außerdem mit Rücksicht auf eine vielleicht noch vermehrte praktische Bedeutung des Pneumokokkenserums in Zukunft an einigen bereits mehrere Jahre alten Pneumokokkenseris die Haltbarkeit des Serums unter gewöhnlichen Verhältnissen untersucht werden.

Ueber den Vergleich der Immunitätswerte einiger Antipneumokokkensera hat Puntoni[1]) neuerdings Untersuchungen veröffentlicht. Der Autor prüfte in Schutzversuchen ein von Tizzoni in Bologna hergestelltes, sowie das Berner und Mercksche Pneumokokkenserum. Aus dem uns zur Verfügung stehenden Referat in der Wiener klinischen Wochenschrift (Jahrgang 1912, S. 771) geht über die Wirkungsweise der Sera nur hervor, daß das italienische Serum in Versuchen an Rindern und kleineren Laboratoriumstieren den beiden anderen genannten, in seiner Schutzwirkung erheblich überlegen sich zeigte. Nach Abschluß unserer Untersuchungen erhielten wir durch die Liebenswürdigkeit von Herrn E. Merck in Darmstadt Einsicht in ein Referat einer in polnischer Sprache erschienenen Arbeit von St. Saski „Ueber den Gehalt an spezifischen Antikörpern der Antipneumokokkensera von Merck und des Sächsischen Serumwerks“. Aus dem deutschen

1) Gazetta degli Ospedale, 1912, No. 21.

Referat geht nur hervor, daß die Prüfung sich erstreckte auf Agglutinine, Präzipitine, komplementbindende Antikörper, Bakteriotropine, Bakterizidine und antibakterielle Schutzstoffe. Nähere Angaben über einen etwaigen Paralellismus einiger dieser Substanzen sind nicht enthalten. Als Schlußresultat findet sich verzeichnet, daß das MERCKsche Serum an Schutzkraft dem Sächsischen Serum sich bedeutend überlegen zeigte.

Unsere Untersuchungen hatten sich auf die gleichen Antikörper im Pneumokokkenserum erstreckt, wie die in der Arbeit von SASKI angeführten. Dazu standen uns Pneumokokkensera zur Verfügung aus den Farbwerken in Höchst, dem Sächsischen Serumwerk in Dresden, sowie der chemischen Fabrik von E. MERCK in Darmstadt, d. s. die drei fabrikmäßig in Deutschland hergestellten und wohl fast ausschließlich bei uns in der Praxis verwendeten Pneumokokkensera. Für die freundliche Ueberlassung der Sera sind wir den genannten Herstellungsstätten zu lebhaftem Dank verpflichtet.

Die bei den einzelnen Versuchen zur Verwendung gelangten Pneumokokkenstämme waren folgender Art:

1. Stamm H., ein noch ziemlich frisch isolierter, hoch virulenter „typischer" (s. u.) Stamm.
2. Stamm 9 und Stamm N.: beides bei der Herstellung des Höchster Serums mitverwendete Immunisierungsstämme.
3. Stamm Dr., ein bei der Herstellung des Sächsischen Serums benutzter Stamm.
4. Ein „aptypischer", d. h. durch die drei gebräuchlichen Immunsera nicht beeinflußter echter Pneumokokkenstamm.
5. Stamm Marx, ein bisweilen bei der Prüfung im Schutzversuch gegen ganz kleine Infektionsdosen, sowie agglutinatorisch von zweien der drei untersuchten Sera in ganz geringem Maße beeinflußter, offenbar einer anderen Gruppe atypischer Pneumokokken zugehöriger Pneumokokkenstamm.

Das Agglutinationsvermögen der drei vorbezeichneten Sera gegenüber den eben genannten Stämmen ergibt sich aus den nachfolgenden Tabellen 1—3.

Tabelle 1.
Agglutination des Pneum.-Serums Hoechst.

Se.-Verd.	St. H.	St. 9	St. N.	St. Dr.	Atyp. St.	St. Marx
1: 10	0	+	+	schwach +	0	0
1: 25	0	0	0	0	0	0
1: 50	0	0	0	0	0	0
1: 75	0	0	0	0	0	0
1:100	0	0	0	0	0	0
1:150	0	0	0	0	0	0
1:200	0	0	0	0	0	0
Kontr. NaCl.	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2.
Agglutination des Pneum.-Serums Dresden.

Se.-Verd.	St. H.	St. 9	St. N.	St. Dr.	Atyp. St.	St. Marx
1: 10	+++	+++	+++	+++	0	++
1: 25	+++	+++	++	+++	0	+
1: 50	+++	++	+	±	0	0
1: 75	++	+	+ schwach	0	0	0
1:100	+	0	0	0	0	0
1:150	0	0	0	0	0	0
1:200	0	0	0	0	0	0
Kontr. NaCl.	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.
Agglutination des Pneum.-Serums Merck.

Se.-Verd.	St. H.	St. 9	St. N.	St. Dr.	Atyp. St.	St. Marx
1: 10	+++	+++	+++	+++	0	+++
1: 25	+++	+++	++	+++	0	++
1: 50	+++	++	++	±	0	0
1: 75	+++	+	+	0	0	0
1:100	++	0	+ schwach	0	0	0
1:150	++	0	0	0	0	0
1:200	++	0	0	0	0	0
1:300	0	0	0	0	0	0
Kontr. NaCl.	0	0	0	0	0	0

Es zeigt das Serum Höchst lediglich gegen die beiden homologen (d. h. bei seiner Herstellung zur Immunisierung des Serumspenders verwendeten) Stämme und einen heterologen typischen Pneumokokkenstamm eine, in letzterem Falle allerdings nur angedeutete, agglutinierende Wirkung. Der heterologe typische Stamm H, sowie die atypischen Stämme werden agglutinatorisch gar nicht beeinflußt.

Ausgeprägter, wenn auch nur in stärkerer Konzentration, ist das Agglutinationsvermögen der Pneumokokkensera Dresden und Merck. Bemerkenswert erscheint, das ersteres den heterologen typischen Stamm H erheblich weiteragglutiniert als seinen homologen Stamm Dr. und daß beide Sera bis 1:25 auch einen atypischeu Stamm agglutinieren. Erstere Erscheinung ist vielleicht in Uebereinstimmung zu bringen mit der Beobachtung NEUFELDS, der bisweilen von seinen Seris nicht nur homologe, sondern auch einige heterologe Stämme hoher Virulenz beeinflußt sah, dagegen avirulente nicht; es war nämlich der vom Dresdener Serum stärker agglutinierte heterologe Stamm H. zur Zeit der Agglutinationsprüfung in seiner Virulenz (1:10 000 000) dem homologen (1:50000—100000) bedeutend überlegen.

Im Ganzen zeigten also die untersuchten Pneumokokkensera nur geringes agglutinierendes Vermögen. Stets verlief die Agglutination relativ langsam, so daß das Resultat erst nach 24 bis 30 Stunden fixiert werden konnte.

Wie sehr die Haltbarkeit der Agglutinine in Pneumokokkenserum von der Art der Konservierung abhängt, zeigt das Er-

gebnis der Agglutinationsprüfung (Tabelle 4) bei den folgenden drei Seris:

a) fünfjähriges, nach Ehrlichs Methode evakuiert, bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrtes (15—20faches) Trockenserum Merck.

b) $4^1/_2$-jähriges, karbolisiertes (40faches) flüssiges, im Glasfläschchen bei Zimmertemperatur ohne besondere Vorsichtsmaßregeln konserviertes Serum Merck, C. Nr. 1.

c) 4-jähriges (20faches), wie vor beschaffenes und aufbewahrtes Serum Merck, C. Nr. 3.

Zur Agglutinationsreaktion diente Stamm H.

Tabelle 4.
Haltbarkeit der Agglutinine im Pneumokokkenserum.

Se.-Verd.	a	b	c
1: 10	+++	++	0
1: 25	+++	±	0
1: 50	+++	0	0
1: 75	++	0	0
1:100	++	0	0
1:150	+	0	0
1:175	±	0	0
1:200	0	0	0
Kontrolle mit NaCl	0	0	0

Während das evakuiert konservierte Serum in seiner Agglutinationskraft noch fast dem frischen Merckschen Serum (vergl. Ergebnis in Tabelle 3) entsprach, hatten sich die Agglutinine in den beiden flüssigen karbolisierten Seris fast ganz bezw. ganz verloren.

Die Beeinflussung der Agglutinine im Pneumokokkenserum durch Wärme und Licht zeigt nachstehende Tabelle.

Tabelle 5.
Agglutination des Serums Dresden.

a) nach $1^1/_2$ monatiger Aufbewahrung bei 37°
b) „ 3 „ „ „ 37°
c) „ $1^1/_2$ „ „ im diffusen Tageslicht
} 1 mit St. H., 2 „ St. Dr.

Se.-Verd.	a_1	a_2	b_1	b_2	c_1	c_2
1: 10	+++	+++	++	++	+++	+++
1: 25	+++	+	±	±	+++	+
1: 50	++	±	0	0	+	0
1: 75	+	0	0	0	0	0
1:100	±	0	0	0	0	0
1:150	0	0	0	0	0	0
1:200	0	0	0	0	0	0
NaCl-Kontrolle	0	0	0	0	0	0

Es scheint danach Wärme in mäßigen Graden in der Zeiteinheit weniger auf die Agglutinine zu wirken als das diffuse (also von Wärmestrahlen ziemlich freie) November-Dezember-Tageslicht. Bei längerer

Dauer der Wärmewirkung zeigt sich naturgemäß eine stärkere Abnahme der Agglutinine (vergl. b_1 und b_2).

Die Ergebnisse der Prüfung des Präzipitationsvermögens der einzelnen Sera finden sich in nachfolgender Tabelle (6) zusammengestellt. Als Antigen dienten klar zentrifugierte Schüttelextrakte der einzelnen Pneumokokkenstämme.

Tabelle 6.
Serum je 0,1 ccm, Extrakt je 0,9 ccm.

Extrakt aus:	St. H.			St. 9			St. Dr.			St. N.			Atyp. St.			St. Marx		
nach:	Sofort	5′	15′	Sofort	5′	15′	Sofort	5′	15′	Sofort	5′	15′	Sofort	5′	15′	Sofort	5′	15′
Se. Höchst	0	±	±	0	+	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Se. Dresden	0	+	++	0	0	0	0	±	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Se. Merck	0	++	+++	0	+	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±
Normal.Pf.-Se.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Durchweg ist die Präzipitation nur gering. Ebenso wie bei der Agglutination zeigt auch hier das Serum Merck und zwar wieder mit dem hochvirulenten Stamm H. die ausgeprägteste Reaktion. Beachtung verdient mit Rücksicht auf das Agglutinationsergebnis und (das später mitgeteilte) Ergebnis im Schutzversuch, die — wenn auch nur minimalste — Präzipitation durch das Antigen Marx. Beim Serum Dresden ist gleich der Agglutination auch die Präzipitation mit Extrakt aus dem heterologen Stamm H. wieder um ein Geringes stärker als mit dem zugehörigen Stamm Dr. Das Serum Höchst vermag nur mit einem seiner homologen Stämme deutlich zu präzipitieren.

Genau so wie auf die agglutinierenden Antikörper scheint auch auf die präzipitierenden das diffuse Tageslicht stärker einzuwirken, als mäßige Wärmegrade trotz längerer Einwirkung derselben (s. folgende Tabelle).

Tabelle 7.
Präzipitation des Serums Dresden:
a) nach $1^1/_2$-monatiger Konservierung im diffusen Tageslicht,
b) nach 3-monatiger Konservierung bei 37°.
Extrakt aus Stamm H.

		Resultat nach sofort	5 Minuten	15 Minuten
a) I.Se. 0,1	+ Extrakt 0,9 ccm	0	0	0
b) I.Se. 0,1	+ „ 0,9 „	0	+	+ bis ++
Normales Pferde-Se.	+ „ 0,9 „	0	0	0
NaCl-Lösung	+ „ 0,9 „	0	0	0

Während aus dem Gehalt eines Immunserums an Agglutininen und Präzipitinen nach allgemeiner Ansicht ein Rückschluß auf seine Schutz- und Heilkraft nicht gezogen werden kann, ist dies aus dem Gehalt an

eigentlichen Immunkörpern: den Bakterizidinen und für die Kokkensera besonders den Bakteriotropinen wohl eher möglich.

Bakterizidine ließen sich in keinem der drei Sera im Plattenversuch nachweisen.

Das Verhalten der bakteriotropen Antikörper ergibt sich aus den nachstehenden Tabellen 8—10[1]).

Tabelle 8.
Tropinversuche mit Serum Hoechst.

Se.-Verd.	Immunisierungs St. 9	Immunisierungs St. N.	St. H.	St. Dr.	Atyp. St.	St. Marx
0,02	schwach +	+ bis ++	+	0	0	0
0,01	±	schwach +	+	0	0	0
0,005	±	±	±	0	0	0
0,002	fast 0	0	±	0	0	0
0,001	„ 0	0	±	0	0	0
0,0005	„ 0	0	0	0	0	0
0,0002	„ 0	0	0	0	0	0
0,0001	„ 0	0	0	0	0	0
Kontr. 0,2 NaCl.	„ 0	0	0	0	0	0

Tabelle 9.
Tropinversuche mit Serum Dresden.

Se.-Verd.	Immunisierungs St. Dr.	St. H.	St. 9	St. N.	Atyp. St.	St. Marx
0,02	0	+++	++	0	0	0
0,01	0	++ bis +++	++	0	0	0
0,005	0	++	+ bis ++	0	0	0
0,002	0	+	+ bis ++	0	0	0
0,001	0	±	+	0	0	0
0,0005	0	0	±	0	0	0
0,0002	0	0	fast 0	0	0	0
0,0001	0	0	„ 0	0	0	0
Kontr. 0,2 NaCl.	0	0	„ 0	0	0	0

Tabelle 10.
Tropinversuche mit Serum Merck.

Se.-Verd.	St. H.	St. 9	St. N.	St. Dr.	Atyp. St.	St. Marx
0,02	+++	++ bis +++	0	+	0	0
0,01	+++	++	0	±	0	0
0,005	++	++	0	0	0	0
0,002	++	++	0	0	0	0
0,001	+ bis ++	+ bis ++	0	0	0	0
0,0005	schwach +	+ bis ++	0	0	0	0
0,0002	0	+	0	0	0	0
0,0001	0	∓	0	0	0	0
Kontr. 0,2 NaCl.	0	±	0	0	0	0

1) Bezüglich der Technik vergl. Boehncke, Zur Methodik des bakteriotropen Reagenzglasversuchs. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 67, 1913.

Eindeutige Resultate ergaben also nur die mit Stamm H. angestellten Versuche. Dieser hochvirulente Stamm wird von allen drei Seris, allerdings in sehr verschiedener Weise beeinflußt. Dem niedrigen bakteriotropen Titer des Serums Höchst mit 1:100, steht ein Titer von 1:500 beim Serum Dresden und 1:1000 (evtl. sogar noch 1:2000) beim Serum Merck gegenüber. Die Resultate mit dem avirulenten Stamm 9, die auf den ersten Blick noch besser erscheinen, sind wegen Spontanphagozytose auch in der Kontrolle nicht ganz verwertbar. Der andere schwach virulente homologe Stamm N. wird vom Serum Höchst auch nur knapp bis 1:100 phagozytiert. Bemerkenswert erscheint das völlige Versagen des Serums Dresden gegenüber dem homologen Stamm Dr. Insgesamt ergeben die Resultate genau das Gegenteil der Angaben von Wadsworth. Nach diesem Autor sollen nämlich nur avirulente Stämme in vitro der spezifischen Phagozytose unterliegen, dagegen virulente Pneumokokken auch in Gegenwart von Immunserum niemals phagozytiert werden. Nach dem Parallelismus unserer hier geschilderten Resultate mit den Ergebnissen der später folgenden Schutzversuche möchten wir aber an der Richtigkeit der Behauptungen Wadsworths Zweifel hegen.

Der Besitz der vorher erwähnten mehrere Jahre alten Pneumokokkensera, ermöglichte uns die Prüfung der Haltbarkeit der bakteriotropen Substanzen im Pneumokokkenserum (Tabelle 11). Wie dem einen von uns (Boehncke) bereits aus Tropinversuchen mit verschiedenen Meningokokkenseris bekannt war, scheinen die Bakteriotropine relativ stabile Antikörper zu sein, weit haltbarer jedenfalls als die Agglutinine, vielleicht nicht so haltbar allerdings wie die Antitoxine. (Marx[1]), Otto[2]), Boehncke nach neueren hier veröffentlichen Unter-

Tabelle 11.
Tropinversuche mit mehrjährigen Seris:
a) Trockenserum (5-jährig)
b) flüssiges Serum Kontrollnummer 1 ($4^1/_2$-jährig) } mit Stamm H.
c) flüssiges Serum Kontrollnummer 3 (4-jährig)

Se.-Verd.	a	b	c
0,02	++	++ bis +++ [3])	++
0,01	+ bis ++	++	+ bis ++
0,005	+ bis ++	+	schwach +
0 002	schwach +	schwach +	fast 0
0,001	fast 0	fast 0	0
0,0005	fast 0	0	0
0,0002	0	0	0
0,0001	0	0	0
Kontr. 0,2 NaCl	0	0	0

1) Festschrift z. 60. Geburtstag von R. Koch, 1903.
2) Arch. f. Schiffs- u. Tropen-Hyg., Bd. X, 1906.
3) Viel degenerierte Kokkenformen.

suchungen über die Haltbarkeit des Antitoxins im Diphtherie- und Tetanusserum; (s. dieses Heft S. 5—12).

Wenn das 5-jährige standardmäßig konservierte Trockenserum noch einen Titer bis 1:5000 zeigte, so war das — ziemlich im Einklang stehend mit den Ergebnissen der Agglutinations-Reaktion — weniger erstaunlich als das gleiche bezw. fast gleiche Resultat auch bei den beiden anderen $4^1/_2$- bezw. 4-jährigen flüssigen, einfach bei Zimmertemperatur gehaltenen Pneumokokkenseris, deren Agglutinationstiter nur noch 1:10 bezw. gleich 0 war.

Sobald aber die Aufbewahrung eines Serums unter direkt schädigenden Bedingungen geschieht, zeigt sich eine relativ rasche Abnahme des bakteriotropen Titers (Tabelle 12) und zwar ziemlich gleichsinnig bei Wärme- oder Lichteinwirkung um das 10—20fache gegenüber dem normalen Titer.

Tabelle 12.

Tropinversuche bei Serum Dresden:

a) nach $1^1/_2$-monatiger Aufbewahrung im diffusen Tageslicht } mit Stamm H.
b) nach 3 „ „ bei 37°

Se.-Verd.	Resultat a	Resultat b
0,02	schwach +	+
0,01	fast 0	schwach +
0,005	0	∓
0,002	0	0
0,001	0	0
Kontr. NaCl	0	0

Von den in vitro nachzuweisenden spezifischen Substanzen des Pneumokokkenserums blieb noch das Verhalten der komplementbindenden Antistoffe zu prüfen. Es schien dies auch von praktischer Bedeutung, seitdem von Kolle und v. Wassermann der Nachweis derselben zur Wertbemessung des Meningokokkenserums herangezogen ist und von Boehncke in neueren an anderer Stelle[1]) niedergelegten Untersuchungen für diese in der Regel ein Parallelgehen mit den bakteriotropen Stoffen im Meningokokkenserum erwiesen werden konnte. Im Pneumokokkenserum scheint ihr Nachweis erheblichen Schwierigkeiten zu begegnen. Jedenfalls ließ sich in den untersuchten Seris niemals, wie hier gleich vorweggenommen sein mag, ein Parallelismus mit den Bakteriotropinen oder anderen in vitro reagierenden Antikörpern erkennen, im Gegenteil, ihr Verhalten war ein völlig paradoxes.

Die Sera wurden vor Gebrauch $^1/_2$ Stunde bei 56° inaktiviert und in fallenden Verdünnungen mit spärlichen, vorher austitrierten Antigenmengen und mittleren Ambozeptordosen (doppelt bis 3fach lösende Menge) angesetzt. Zunächst gelangte als Antigen ein Schüttelextrakt

1) S. dieses Heft S. 17 ff.

(mit Aqua destillata) aus Stamm H. zur Anwendung. Es ergab dabei komplette, bezw. fast komplette spezifische Hemmung:

Serum Merck bis zur Verdünnung 1:10
„ Dresden „ „ 1: 2
„ Höchst nur in der Verdünnung 1:1000.
5-jähr. Serum Merck (trocken) bis zur Verdünnung 1:200

In weiteren Versuchen gelangte ein multipartialer Schüttelextrakt aus den oben genannten 5 Pneumokokkenstämmen zur Verwendung. Damit zeigte das gleiche Resultat:

Serum Merck bis zur Verdünnung 1:5
„ Dresden „ „ 1:6
„ „ nach 3 Mon. bei 37° bis zur Verdünnung 1:3
„ Höchst bis zur Verdünnung 1:2000 (spezifisch erst von 1:200 ab).

Bemerkt sei noch, daß die vergleichenden Versuche an demselben Tage mit demselben hämolytischen System und gleichen Extraktdosen angestellt wurden. Mit anderen (Streptokokken-, Staphylokokken-, Meningokokken-) Extrakten, zeigte sich bei keinem Serum Komplementbindung.

Es wäre danach der Gehalt an komplementfixierenden Stoffen in unseren Pneumokokkenseris diametral entgegengesetzt den anderen in vitro nachgewiesenen Antikörpern und besonders, wie sich unten zeigen wird, auch umgekehrt proportional der Schutzwirkung der Sera in vivo. Bemerkt sei noch, daß Isabolinsky[1]) mit verschiedenen Pneumokokkenantigenen und Pneumokokkenseris ein positives Resultat überhaupt nicht zu erzielen vermochte. Saski[2]) dagegen hatte bei 10 verschiedenen Stämmen 8mal positives und zweimal negatives Ergebnis. Genauere Untersuchungen zur Klärung dieser merkwürdigen Erscheinungen müßten noch angestellt werden.

Mangels eines wirksamen „Pneumokokkentoxins“, dessen Herstellung uns bisher weder durch Ausschütteln auszentrifugierter Kokken in Aqu. destill., noch Auflösen der Kulturen in Kochsalzlösungen von Natrium taurocholicum gelang, konnte eine Prüfung unserer Sera auf etwaige besondere antitoxische Qualitäten nicht stattfinden. Wir mußten uns vielmehr darauf beschränken, die allgemeine Schutzwirkung der Sera im Tierversuch zu prüfen.

Zunächst wurden sämtliche Pneumokokkensera gleichzeitig in fallenden Mengen gegenüber der 100fach tödlichen Dosis des für alle Sera heterologen Stammes H. geprüft.

Wie aus Tabelle 13 ersichtlich, versagte diesem Pneumococcus gegenüber das Serum Höchst und Dresden fast vollständig: Es kamen davon nur die mit 0,1 Serum gespritzten Mäuse, alle anderen über-

1) Wratschebnaja Gazeta, 1909, No. 28.
2) l. c.

Tabelle 13.
Prüfung im Schutzversuch gegenüber dem heterologen Stamm H.
Serum subkutan, Kultur intraperitoneal. 24 Stunden später.

Serum-Verdünnung	Kultur	Se. Höchst					Se. Dresden					Se. Merck					Aeltere Pneumokokkensera: Standard-Se.					C. Nr. 1.					C. Nr. 3				
je 1,0 ccm	je 0,5 ccm	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
1:10 =0,1	$^1/_{10000}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:100 =0,01	„	0	+				0	0	+			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:250 =0,004	„	0	+				0	?	+			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:500 =0,002	„	?	+				0	?	+			0	0	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	+				
1:1000=0,001	„	?	+				?	+				0	?	0	0	0	+					0	0	0	0	0	0	+			
1:2000=0,0005	„	kr	+				?	+				0	?	+			0	0	0	0	0	0	0	?	+		0	0	0	+	
—	„	kr	+																												
—	„	?	+																												
—	„	kr	?	+																											

lebten die Kontrolltiere längstens um 1—2 Tage. Weit stärkere Schutzwirkung zeigten alle MERCKschen Sera. Das frische Serum schützte noch in der Verdünnung 1:100; das $5^1/_2$-jährige, ursprünglich als 15—20faches bezeichnete, Standardserum schützte noch in der Verdünnung von 1:500. Die beiden $4^1/_2$-, bezw. 4-jährigen flüssigen, ohne besondere Sicherheitsmaßnahmen aufbewahrten MERCKschen Sera (Kontrollnummer 1 und 3) zeigten Schutzwirkung noch in der Verdünnung von 1:1000 bezw. 1:250. Trotz dieser relativ guten Wirkung läßt sich bei den letzten drei Seris doch eine erhebliche Abnahme ihrer Schutzkraft gegen die früher vorhandene konstatieren. Denn ursprünglich hatte das Standardserum im Schutzversuch bei gleicher Versuchsanordnung sich noch in der Verdünnung von 1:1500 bis 1:2000, Serum No. 1 sogar bis 1:4000 und Serum No. 3 bis 1:2000 wirksam erwiesen. Dabei ist aber zu beachten, daß die Titerangaben sich beziehen auf frühere Prüfungen gegen einen homologen Stamm, wovon uns jetzt leider keiner zur Verfügung stand. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß entsprechend dem relativ hohen bakteriotropen Titer dieser Sera gegenüber einem homologen Stamm auch die Schutzkraft im Tierversuch gegenüber einem solchen eine noch bessere gewesen wäre, wie z. B. auch das frische von der Fabrik als 20fach bezeichnete Serum gegenüber dem heterologen Stamm H. sich nur als 10fach erwies.

Es war nun von Interesse zu prüfen, ob die Sera Höchst und Dresden gegenüber ihren homologen Stämmen bessere Resultate ergaben. Für das erstere Serum standen hierfür die uns aus der Fabrik freundlichst überlassenen Stämme 9 und N. zur Verfügung. Der Stamm 9 erwies sich uns jedoch als avirulent im Mäuseversuch (noch 1 ccm einer Verdünnung 24-stündiger Bouillonkultur auf 1:10 vermochte weiße Mäuse in 5 Tagen nicht zu töten). Gegenüber dem mäßig virulenten homologen Stamm N (mit 0,5 ccm $^1/_{1000}$ 24-stündiger Bouillon-

kultur bei i. p. Injektionen $+_2$) zeigte das Serum Höchst Schutzwirkung bis zur Dosis von 0,004 (Verdünnung 1:250) also um das 25- bezw. 250fach stärkere als gegenüber den heterologen Stämmen H und Dr. (s. oben und Tabelle 13a). Auch Serum Dresden erwies sich gegenüber seinem homologen (virulenten) Stamm Dr. wesentlich wirksamer als gegen den heterologen Pneumokokkus H. (vergl. oben und Tabelle 13a). Interessant war, daß die Schutzkraft des MERCKschen Serums gegenüber dem heterologen Stamm Dr. nicht so ausgesprochen war, wie bei dem ebenfalls heterologen Stamm H., obwohl dieser noch höhere Virulenz hatte als der Stamm Dr.

Tabelle 13a.
Prüfung im Schutzversuch gegen Stamm Dresden, 24-stündig.
Serum subkutan, Kultur intraperitoneal, 24 Std. später.

Se.-Verd.	$^1/_{10000}$ Kultur	Maus	Serum Höchst					Serum Dresden					Serum Merck				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
$^1/_{10}$ =0,1	0,5 ccm	K. gelb	?	+				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$^1/_{100}$ =0,01	„ „	N. „	?	+				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$^1/_{250}$ =0,004	„ „	R. „	kr.	+				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$^1/_{500}$ =0,002	„ „	St. „	+	+				0	?	?	0	0	0	0	0	0	0
$^1/_{1000}$=0,001	„ „	r. Seite gelb	kr.	+				0	+				0	0	+		
$^1/_{2000}$=0,0005	„ „	l. „ „	ag.	+				0	+				0	0	+		
—	„ „	Bauch „	+ $1^1/_2$														
—	„ „	„ „	+ $1^1/_2$														

Man kann somit annehmen, daß weniger die Virulenz des (typischen) Prüfungsstammes als vielmehr das Passen des Rezeptorenapparates den Effekt des Pneumokokkenserums beeinflußt und daß schon daraus die Zweckmäßigkeit der Verwendung möglichst vieler Stämme mit verschiedenem Rezeptorenapparat zur Immunisierung erhellt.

Tabelle 14.
Schwellenwertbestimmung sämtlicher Sera gegen Stamm H. 24-stündig.
Serum in gleicher Dosis subkutan, Kultur in fallenden Dosen nach 24 Std. i. p.

Serum 1:10	Kultur Verd.	Maus	Se. Höchst					Se. Dresden					Se. Merck					Se. Merck Nr. 1					Se. Merck Nr. 3					Merck Stand.-Se.				
1 ccm	0,5 ccm	Nr.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
0,1	1:10	1	+					+					0	0	0	0	0	+					+					0	+			
„	1:100	2	?	+				0	0	+			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	+			0	0	0	0	0
„	1:125	3	0	+				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„	1:250	4	0	0	+			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„	1:500	5	0	?	+			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„	1:5000	6	0	?	+			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
—	1:5000	7	+																													
—	1:10000	8	?	+																												
—	1:100000	9	0	?	+																											
—	1:500000	10	0	?	+																											

Von ausschlaggebender Bedeutung ist nach NEUFELD und HAENDEL für die Wertbemessung eines Pneumokokkenserums aber erst der Ausfall der Prüfung starker Serumdosen gegen massive Kulturdosen, die von den Autoren sog. „Schwellenwert"bestimmung des Serums. Dazu wurden Reihen weißer Mäuse mit gleichen Serumdosen (0,1 = 1 ccm $^1/_{10}$) subkutan vorbehandelt und 24 Stunden später die Kultur, beginnend mit der überaus starken Infektionsdosis von 0,5 ccm der Verdünnung 1:10 von 24-stündiger Bouillonkultur intraperitoneal infiziert. Die dabei erzielten in Tabelle 14 verzeichneten Resultate stellen ein getreues Spiegelbild der vorher geschilderten Ergebnisse bei den Schutzversuchen gegen konstante mindere Infektionsdosen dar.

Auch bei der Schwellenwertbestimmung zeigt gegenüber dem für alle Sera heterologen Pneumococcus H. das MERCKsche Serum den stärksten Effekt. Während das Serum Höchst ganz versagt, hat das Dresdener Serum noch zu schützen vermocht gegen die Kulturverdünnung 1:125. Von den mehrjährigen MERCKschen Pneumokokkenseris zeigt auch hier wieder die Kontrollnummer 3 die schwächste Schutzwirkung. Es genügt hinzuzufügen, daß der Schwellenwert des Serums Höchst gegen den homologen Stamm N. wieder beträchtlich erhöht — bis zur Kulturverdünnung 1:100 — war. Der Schwellenwert der drei Sera, Höchst, Merck und Dresden, gegenüber Stamm Dr. ergibt sich aus nachstehender Tabelle, wo wieder die Verbesserung des Resultates bei Injektionen des homologen Serums erkennbar ist.

Tabelle 15.

Schwellenwertbestimmung der Sera gegenüber Stamm Dr. 24-stündig. Serum subkutan; Kultur in fallenden Mengen 24 Std. später i. p.

Serum 1:10	Kultur-Verd.	Maus	Serum Höchst					Serum Dresden					Serum Merck				
1 ccm	0,5 ccm	Nr.	Tag:					Tag:					Tag:				
			1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
0,1	1:10	1	?	+				+					+				
„	1:100	2	?	kr.	+			0	?	?	0	0	0	0	0	0	0
„	1:125	3	0	?	?	+		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„	1:250	4	0	+				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„	1:500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„	1:5000	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
—	1:5000	7	+														
—	1:10000	8		+													

Nach den bisher besprochenen Ergebnissen war man vielleicht berechtigt, dem Pneumokokkenserum Merck eine gewisse Polyvalenz zuzusprechen. Wirklich polyvalent war aber auch dieses Serum nicht. Das zeigte sein (wie der anderen untersuchten Pneumokokkensera) vollständiges Versagen bei Schutzversuchen gegenüber dem differentialdiagnostisch als echten Pneumococcus anzusprechenden, oben unter

No. 4 aufgeführten und wegen seiner Resistenz aller Seris gegenüber als atypisch bezeichneten Stamm. Daß dem Serum Merck andererseits doch polyvalente Qualitäten, wenn auch nur in beschränktem Maße zukamen, darauf konnte man aus seiner teilweisen Wirksamkeit gegenüber den vorher unter No. 5 gekennzeichneten Pneumococcus Marx schließen. In der gewöhnlichen Versuchsanordnung (10- bis 100fache Dosis letalis und fallende Serummengen) zeigten sich alle drei Sera ohne eine Spur von Wirkung. Wurden aber konzentrierte Serummengen (0,2—0,1—0,02) gegenüber der nur ca. 2fach tödlichen Infektionsdosis verwendet, so zeigte das Serum Merck sich regelmäßig wirksam, während die beiden anderen Sera Höchst und Dresden auch unter diesen Umständen jede Wirkung vermissen ließen. Bei Verwendung aller drei Sera als Mischserum zu gleichen Teilen, sank sofort der Wirkungseffekt auf 0,2 Gesamtserum, ein Zeichen, daß nur der Anteil des Merck-Serums von 0,066 ccm im Gemisch eine Wirkung ausübte.

Resümierend läßt sich sagen, daß im Ganzen ein gewisser Parallelismus zwischen dem Gehalt an in vitro nachzuweisenden Antistoffen eines Pneumokokkenserums und dem Grad seiner Schutzwirkung in vivo unverkennbar ist. Deutlicher wird dieser Parallelismus nur bei den in vivo wohl sicher in Wirkung tretenden Antikörpern: den Bakteriotropinen. Ein umgekehrtes Verhalten zeigten die komplementbindenden Stoffe.

Eine ausgesprochene Polyvalenz zeigte keines der untersuchten Sera weder in vitro noch in vivo. Eine gewisse, freilich nur beschränkte Polyvalenz in der Wirksamkeit dürfte auf Grund der Ergebnisse im Regenzglas- und im Schutzversuch dem von uns untersuchten Pneumokokkenserum Merck nicht abzusprechen sein.

Ueber den Gehalt an komplementbindenden Antistoffen im Pneumokokkenserum, deren Verhalten in unseren Versuchen ein ganz paradoxes war, können erst eingehendere Untersuchungen Klarheit schaffen.

Was die Haltbarkeit des Pneumokokkenserums betrifft, so zeigten sich bei einer Aufbewahrung unter gewöhnlichen Verhältnissen in flüssigen, 4—4$^1/_2$ Jahre alten Seris die Agglutinine als sehr labile, die Bakteriotropine dagegen als relativ stabile Substanzen. Im Schutzversuch zeigten diese Sera noch ca. $^1/_4$ bis $^1/_8$ ihrer ursprünglich angegebenen Wirksamkeit. Hieraus dürfte sich auch ohne weiteres ergeben, daß aus dem Gehalt an Agglutininen (und komplementbindenden Stoffen?) keinerlei Schlüsse auf die Wirksamkeit eines Pneumokokkenserums in vivo gestattet sind, wohl ber aus dem in vitro nachgewiesen en Gehalt an Bakteriotropinen,

denen somit ein beträchtlicher Anteil an der spezifischen Wirkung des Serums im Tierversuch zuzuschreiben sein dürfte. Genaueren Aufschluß über den Anteil der bakteriotropen Substanzen und eventueller antitoxischer, sowie bakterizider Substanzen des Pneumokokkenserums an den Heilungsvorgängen bei der Pneumokokkeninfektion sollen uns weitere Versuche ergeben, mit denen wir bereits seit längerer Zeit beschäftigt sind.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Arbeiten aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern und den wissenschaftlichen Laboratorien des Schweizer Serum- und Impf-Instituts. Herausgegeben von Dr. **W. Kolle,** o. Professor der Hygiene und Bakteriologie an der Universität Bern.

1. Heft: I. Kolle, Heller und de Mestral, Untersuchungen über Dysenterietoxine, das Dysenterieserum und seine Wertbestimmung. — II. Guggisberg, Ueber Veränderungen am Zentralnervensystem bei experimenteller Dysenterievergiftung der Kaninchen. (Mit Tafel I und II.) — III. Frey, Studien über Serum-Ueberempfindlichkeit, im besonderen das Theobald Smithsche Phänomen. — IV. Anselmier, Ueber den Nachweis und die Form der Negrischen Körperchen beim Affen, Fuchs und Hamster. (Mit Tafel III.) — V. Laffert, Experimentelle Studien über die Fütterungstuberkulose der Meerschweinchen und die Beeinflussung derselben durch stomachal verabreichtes Tuberkulin. — VI. Tavel, Ueber Streptokokkenserumtherapie. (Mit 10 Kurven.) 1908. Preis: 6 Mark.

2. Heft: I. Krumbein und Diehl, Neue Untersuchungen zur Wertbestimmung des Meningokokken-Serums. — II. Heck, Bericht über die Tätigkeit der Untersuchungsstation des Instituts zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern. — III. Samter, Ueber Resistenzbestimmung verschiedener Staphylokokkenstämme gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen. — IV. Meyer, Ueber die durch säurefeste Bakterien hervorgerufene diffuse Hypertrophie der Darmschleimhaut des Rindes. (Enteritis hypertrophica bovis specifica.) (Mit Tafel I—III und 1 Abbildung im Text.) 1908. Preis: 9 Mark.

3. Heft: I. M. Isabolinsky, Beiträge zur klinischen Beurteilung der Serum-Diagnostik der Syphilis. — II. G. Brüstlein, Ueber die Beziehungen des nach Ehrlichs Methode bestimmten Antitoxingehaltes des Diphtherie-Serums zu dessen Heilwert. — III. H. Heck, Prüfung der Wirksamkeit neuerer Alkoholdesinfektionsmethoden der Hände in Laboratoriumsversuchen und bei Operationen. 1909. Preis: 2 Mark 40 Pf.

4. Heft: Sawamura, Experimentelle Studien zur Pathogenese und Serumtherapie des Tetanus. 1909. Preis: 3 Mark.

5. Heft: Y. Shimodaira: Experimentelle Beiträge zur Wirkungsweise der Bierschen Stauungstherapie. 1910. Preis: 3 Mark 60 Pf.

6. Heft: I. W. Kolle, Das Institut für Hygiene und Bakteriologie (Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten) der Universität Bern. (Mit Tafel I—II und 17 Abbildungen.) — II. E. Tavel, Ueber den Einfluß des Bakteriologischen Instituts der Universität Bern auf die Fortschritte der Chirurgie. — III. O. Heller und M. Rothermundt, Die Verbreitung und Bekämpfung der Hundswut in der Schweiz während der letzten 10 Jahre und die Ergebnisse der Schutzimpfung nach Berichten der Pasteurabteilung. (Mit 2 Abbildungen.) — IV. E. Tomarkin und H. Carrière, Die Lymphegewinnungsanstalt des Schweizer Serum- und Impfinstituts am Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten. (Mit 15 Abbildungen.) — V. W. Kolle, F. Krumbein und W. Schürmann, Die Technik der Immunisierung größerer Tiere und der Serumgewinnung in den Laboratorien des Schweizer Serum- und Impfinstituts. (Mit 12 Abbildungen.) — VI. A. A. Beutter, Heizungs- und Lüftungsanlage, Warmwasserversorgung, Kühlraum und Kadaververbrennungsofen. (Mit Tafel III und IV und 1 Abbildung.) — Verzeichnis der Arbeiten aus dem Hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Bern. 1896—1910. (Mit 4 Tafeln und 47 Abbildungen im Text.) 1910. Preis: 4 Mark 50 Pf.

7. Heft: W. Schürmann und S. Abelin, Der augenblickliche Stand der bakteriologischen Choleradiagnose mit Berücksichtigung und auf Grund von Prüfungen der neuesten Anreicherungs- und Differenzierungsmethoden. Mit 2 Abbildungen im Text. 1912. Preis: 1 Mark 50 Pf.

Arbeiten aus dem Pathologischen Institut Helsingfors (Finnland.) Herausgegeben von Prof. Dr. **E. A. Homén. Die Wirkung einiger Bakterien und ihrer Toxine auf verschiedene Organe des Körpers.** (Abdruck aus „Acta Societatis scientiarium Fennicae". Tom. XXX.) Mit 13 Tafeln. 1913. Preis: 30 Mark.

Inhalt: I. **Die Wirkung einiger Bakterien und ihrer Toxine auf periphere Nerven, Spinalganglien und das Rückenmark.** Von Prof. E. A. Homén. Mit 2 Tafeln. — II. **Trauma als beförderndes Moment bei den durch einige Bakterien (resp. ihre Toxine) hervorgerufenen Veränderungen im Gehirn.** Von Dr. Ernst Ehrnrooth. Mit 4 Tafeln. — III. **Die Einwirkung einiger Bakterien und ihrer Toxine auf die Leber.** Von Dr. Max Björkstén. Mit 3 Tafeln. — IV. **Die Einwirkung der Staphylokokken und ihrer Toxine auf die Muskeln.** (Vorläufige Mitteilung.) Von Dr. Max Björkstén. Mit 1 Tafel. — V. **Einwirkung gewisser Bakterien und ihrer Toxine auf die Nieren und die Ausscheidung dieser Bakterien durch dieselben.** Von Dr. Osw. Streng. Mit 2 Tafeln. — VI. **Die Wirkung der Staphylokokken auf die Lungen.** Von Dr. J. Silfvast. Mit 1 Tafel. — VII. **Experimentelle Untersuchungen über die durch Bakterientoxine hervorgerufenen Kachexien.** (Vorläufige Mitteilung.) Von Dr. Osw. Streng.

Paul-Ehrlich-Institut
00203102